



Universidad Autónoma  
de Madrid

**Facultad de Medicina**

Departamento de Bioquímica

**Papel de TWEAK y sus receptores Fn14 y  
CD163 en el remodelado vascular  
patológico**

**Carmen Gutiérrez Muñoz**

**Madrid, 2021**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Bioquímica**

**Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares**

**Papel de TWEAK y sus receptores Fn14 y  
CD163 en el remodelado vascular  
patológico**

Tesis doctoral presentada por **Carmen Gutiérrez Muñoz**,  
Graduada en Biología

**Máster en Biomedicina Molecular**

Trabajo dirigido por el **Dr. Luis Miguel Blanco Colio** y la **Dra. Nerea Méndez Barbero** y llevada a cabo en el laboratorio de Patología Vascular del IIS- Fundación Jiménez Díaz.

## Resumen

El inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (*Tnfsf12*; TWEAK) y su receptor Fn14 (*Tnfrsf12a*) participan en la respuesta inflamatoria asociada al remodelado vascular patológico. Sin embargo, no se han descrito en su totalidad los efectos funcionales de TWEAK sobre las células del músculo liso vascular (CMLV). Mediante análisis de secuenciación masiva del transcriptoma completo se identificaron genes regulados por TWEAK en las CMLV. Tras el enriquecimiento funcional, la mayoría de los términos de ontología génica obtenidos se relacionaron con proliferación celular. Mediante experimentos *in vitro* en CMLV de tipo salvaje o deficientes en *Tnfrsf12a* demostramos que TWEAK aumentaba la proliferación y migración celular a través del aumento de la expresión de la ciclina D1 y de las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 así como de la reducción del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p15<sup>INKB</sup>, todo ello mediado por la activación de las quinasas ERK 1/2 y Akt. Mediante un modelo de angioplastia en la arteria femoral de ratón evaluamos el papel que juega el eje TWEAK/Fn14 durante la hiperplasia de la neoíntima. La delección génica de *Tnfrsf12a* o *Tnfsf12* así como la intervención farmacológica con el anticuerpo bloqueante anti-TWEAK redujeron la formación de la neoíntima, disminuyendo la proliferación celular, la expresión de ciclina D1 y CDK4/6 y aumentando la expresión de p15<sup>INK4B</sup> en comparación con las arterias de ratones de tipo salvaje o tratados con IgG. Finalmente, observamos que TWEAK y Fn14 se expresan en arterias coronarias humanas con estenosis o reestenosis post-angioplastia.

Por otro lado, quisimos analizar el papel de CD163, un posible receptor basurero de TWEAK, en el desarrollo de la aterosclerosis. Realizamos un modelo de aterosclerosis en ratones deficientes para *ApoE* o doble deficientes para *ApoE/CD163*. Los ratones deficientes en *CD163* mostraron placas más inestables, de mayor tamaño, con un aumento en el contenido de lípidos y macrófagos, y expresión de citoquinas proinflamatorias. *In vitro*, la ausencia de CD163 en macrófago tipo 2 favoreció la formación de células espumosas mediante la regulación positiva de la expresión de CD36. La administración de TWEAK exógeno aumentó el tamaño de la lesión aterosclerótica, el contenido de lípidos y macrófagos en ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>*, y el pretratamiento con CD163 recombinante revirtió estos efectos. Así mismo, CD163 inhibió los efectos proinflamatorios de TWEAK en las CMLV, disminuyendo la activación de NF-κB, la expresión de citoquinas y metaloproteinasas y la migración de macrófagos.

En conclusión, nuestro estudio demuestra el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 en el control de la proliferación y migración de las CMLV durante la hiperplasia de la neoíntima tras angioplastia, y propone este eje como diana para el tratamiento de la reestenosis. Además, la expresión de CD163 por macrófagos podría ser un mecanismo protector para prevenir los efectos perjudiciales de TWEAK sobre el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica.

## Abstract

Tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (*Tnfrsf12*; TWEAK) and its receptor Fn14 (*Tnfrsf12a*) participate in the inflammatory response associated with pathological vascular remodelling. However, the functional effects of TWEAK on vascular smooth muscle cells (VSMCs) are not fully described. Massive sequencing analysis of the whole transcriptome were performed to identify genes regulated by TWEAK in VSMC. After functional enrichment, most of the gene ontology terms obtained were related to cell proliferation. *In vitro* experiments in wild-type or *Tnfrsf12a*-deficient CMLV demonstrated that TWEAK increased cell proliferation and migration through increased expression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6, as well as a reduction of the cyclin-dependent kinases inhibitor p15<sup>INK4B</sup>, all mediated by ERK 1/2 and Akt kinases activation. We evaluated the role of TWEAK/Fn14 axis during neointimal hyperplasia using a femoral artery wire injury mouse model. *Tnfrsf12a* or *Tnfrsf12* genetic deletion and pharmacological intervention with TWEAK blocking antibody reduced neointima formation, decreasing cell proliferation, cyclin D1 and CDK4/6 expression and increasing p15<sup>INK4B</sup> expression compared to wild-type or IgG-treated mice arteries. Finally, we observed that TWEAK and Fn14 are expressed in human coronary arteries with post-angioplasty stenosis or restenosis.

On the other hand, we aimed to analyse the role of CD163, a possible TWEAK scavenger receptor, in atherosclerosis development. We performed an atherosclerosis model using *ApoE* deficient or *ApoE/CD163* double deficient mice. *CD163*-deficient mice showed larger and more unstable plaques, with increased lipid and macrophage content, and pro-inflammatory cytokines expression. *In vitro*, the absence of CD163 in type 2 macrophage induced foam cell formation through upregulation of CD36 expression. Furthermore, exogenous TWEAK administration increased atherosclerotic lesion size, lipids and macrophages content in *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> mice and these effects were reverted by pretreatment with recombinant CD163. Likewise, recombinant CD163 inhibited the pro-inflammatory effects of TWEAK on VSMC, decreasing NF-κB activation, cytokines and metalloproteinases expression and macrophage migration.

In conclusion, our study demonstrates the role of TWEAK/Fn14 axis in controlling VSMC proliferation and migration during neointimal hyperplasia after angioplasty and proposes this axis as a potential target for restenosis treatment. Furthermore, CD163-expressing macrophages could be a protective mechanism to prevent the deleterious effects of TWEAK on atherosclerotic plaque development and progression.



# ***ÍNDICE***

## Índice

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>25</b>
1. El sistema cardiovascular.....	25
1.1. Estructura de las arterias. ....	25
1.2. Aorta. ....	26
1.3. Homeostasis del sistema cardiovascular. ....	27
2. Remodelado vascular. ....	28
2.1. Tipos de remodelado vascular: Clasificación. ....	28
2.1.1 Formación de neoíntima (o hiperplasia de la íntima). ....	29
2.1.2 Aterosclerosis. ....	30
2.2. Tratamiento y modelos de estudio de las patologías de remodelado vascular. Angioplastia como tratamiento y reestenosis. ....	33
2.3 Ciclo celular y CMLV en el remodelado vascular. ....	34
3. La superfamilia del Factor de Necrosis tumoral (TNF). ....	36
3.1 TWEAK y sus receptores Fn14 y CD163.....	37
4. Señalización a través del sistema TWEAK-Fn14. ....	40
5. TWEAK y Aterosclerosis. ....	41
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1. Modelos animales experimentales.....	51
1.1. Generación de ratones doble deficientes <i>ApoE/CD163</i> . ....	51
1.2. Procedimientos en animales.....	51
1.2.1. Modelos de aterosclerosis inducida por dieta grasa. ....	51
1.2.2. Modelo de daño en arteria femoral.....	52
1.3. Procesamiento de los tejidos. ....	53
1.4. Procesamiento de las sangres.....	54
2. Procesamiento de muestras humanas. ....	54
3. Cultivos celulares. ....	54

3.1. Células de músculo liso vascular de ratón. ....	54
3.2. Macrófagos peritoneales de ratón. ....	55
4. Ensayos de migración. ....	56
4.1. Ensayos de transwell.....	56
4.2. Ensayos de cierre de herida. ....	57
5. Ensayos de formación de células espumosas.....	57
6. Citometría de flujo.....	58
6.1. Ensayos de ingestión de dil-LDL oxidadas en macrófagos.....	58
6.2. Marcaje de macrófagos. ....	58
6.3. Ensayos de ciclo celular. ....	58
6.4. Ensayos de proliferación.....	58
7. Ensayos de acumulación y salida de colesterol.....	59
8. Transfección con ARN pequeño de interferencia.....	59
9. Análisis de proteínas.....	59
9.1. Extracción de proteínas totales. ....	59
9.2. Western blot. ....	60
10. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). ....	61
11. Análisis de RNA. ....	61
11.1. Extracción de RNA.....	61
11.2. PCR. ....	62
11.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). ....	62
12. Análisis histológico. ....	63
12.1. Procesamiento y análisis morfométrico del seno aórtico, la arteria braquiocefálica y la arteria femoral.....	63
12.2. Tinciones de tejidos con colorantes. ....	64
12.2.1. Hematoxilina & Eosina. ....	64
12.2.2. Oil Red O.....	65
12.2.3. Rojo picosirius. ....	65
12.2.4. Pentacrómico de Movat.....	65
12.3. Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencias. ....	65
12.4. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas, inmunofluorescencias y tinciones.....	68
13. RNA-Seq.....	68
13.1. Construcción y secuenciación de bibliotecas de RNA-seq.....	68
13.2. Enriquecimiento del conjunto de genes. ....	68

13.3. Modulo funcional de extracción y enriquecimiento funcional.....	68
14. Análisis estadístico.....	69
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
1. El eje TWEAK/Fn14 como diana terapéutica en la reestenosis post-angioplastia.....	73
1.1. TWEAK modula la expresión de genes asociados a la proliferación celular en CMLV. ....	73
1.2. TWEAK aumenta la proliferación y migración de CMLV.....	77
1.3. La expresión de p15 <sup>INK4B</sup> y ciclina D1 está regulada por ERK1/2 y Akt en CMLV.....	81
1.4. La pérdida de <i>Tnfrsf12a</i> o <i>Tnfsf12</i> disminuye la formación neointimal en la arteria femoral después de una lesión con guía de angioplastia. ....	82
1.5 El tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK reduce la formación de neointima después de una lesión post-angioplastia en la arteria femoral de ratón.....	86
1.6 Eje TWEAK/Fn14 en el engrosamiento neointimal humano. ....	88
2. El papel de CD163 en la progresión de la lesión aterosclerótica. ....	90
2.1. CD163 favorece la resolución de la placa aterosclerótica. ....	90
2.2. La deficiencia de CD163 aumenta la formación de células espumosas mediante la regulación positiva de CD36. ....	96
2.3. TWEAK agrava la progresión de la aterosclerosis en ratones deficientes en <i>CD163</i> .....	99
2.4. CD163 inhibe la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK en las CMLV y la migración de macrófagos.....	106
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
1. El eje TWEAK/Fn14 como diana terapéutica en la reestenosis post-angioplastia.....	112
2. El papel de CD163 en la progresión de la lesión aterosclerótica. ....	116
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>143</b>

# ***ABREVIATURAS***

## Abreviaturas

<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>AAA</b>	Aneurisma aórtico abdominal.
<b>ABC</b>	Arteria braquiocefálica.
<b>ActD</b>	Actinomicina D.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNc</b>	ADN complementario.
<b>ADNsa</b>	Desoxirribonucleasa.
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B.
<b>Ang II</b>	Angiotensina 2.
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza entre grupos.
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B.
<b><i>ApoE</i><sup>-/-</sup></b>	Ratones deficientes en apolipoproteína E.
<b><i>ApoE</i><sup>-/-</sup><b>CD163</b><sup>-/-</sup></b>	Ratones doble deficientes en apolipoproteína E y en CD163.
<b>Arg</b>	Arginasa.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa.
<b>ARNm</b>	ARN mensajero.
<b>ARNsi</b>	ARN pequeño de interferencia.
<b>ARN-Seq</b>	Secuenciación del Transcriptoma Entero.
<b>BCA</b>	Ensayo de ácido bicinconínico.
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino.
<b>Ccn</b>	Ciclina.
<b>CDK</b>	Quinasas dependientes de ciclina.
<b>CDKI</b>	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina.
<b>CD163</b>	130 kDa miembro de la familia de receptores basureros ricos en cisteína.
<b>CMLV</b>	Células de músculo liso vascular.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.
<b>C57BL/6</b>	Animales de fondo silvestre.

<b>DAB</b>	Tetraclorhidrato de 3,3'- diaminobencidina.
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol.
<b>Dil-Ldlox</b>	Lipoproteínas de bajo peso molecular oxidadas y marcadas con Dil.
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i> .
<b>DPX</b>	Resina acrílica con base de xileno.
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia aumentada.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-glicotetra-acético.
<b>EEM</b>	Error estándar de la media.
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>ERK</b>	Quinasa regulada extracelularmente.
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino.
<b>FDR</b>	Tasa de descubrimiento falso de Benjamini y Hochberg.
<b>Fn14</b>	Factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14.
<b>GO</b>	Ontología génica.
<b>Hb</b>	Hemoglobina.
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad.
<b>Hp</b>	Haptoglobina.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano.
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular.
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia.
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G.
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma.
<b>KDa</b>	Kilodalton.
<b>KEGG</b>	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto.
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa.
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de bajo peso molecular.
<b>LDLox</b>	Lipoproteínas de bajo peso molecular oxidadas.
<b>LXR</b>	Receptor de hígado X.
<b>M1</b>	Macrófagos pro-inflamatorios.

<b>M2</b>	Macrófagos anti-inflamatorios.
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal.
<b>MAPK</b>	Proteína quinasas activadas por mitógenos.
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica para monocitos.
<b>MEC</b>	Matriz extracelular.
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz.
<b>mTWEAK</b>	TWEAK unido a membrana.
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B.
<b>NK</b>	Células asesinas naturales.
<b>Nos2</b>	Sintasa inducible de óxido nítrico 2.
<b>OCT</b>	Compuesto de temperatura de corte optima.
<b>ORO</b>	Tinción de Oil-Red O.
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación.
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
<b>PI</b>	Yoduro de propidio.
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa.
<b>PFA</b>	Paraformaldehído.
<b>PM</b>	Macrófagos peritoneales.
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno.
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
<b>SEM</b>	Error estándar de la media.
<b>SMA</b>	Actina de músculo liso.
<b>sTWEAK</b>	TWEAK soluble.
<b>TBS</b>	Tampón tris salino.
<b>TBS-T</b>	Tampón tris salino con Tween.



<b>TF</b>	Factor tisular.
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1.
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral.
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral.
<b><i>Tnfrsf12a</i><sup>-/-</sup></b>	Ratones deficientes en Fn14 o receptor del factor de necrosis tumoral 12A.
<b>TNFSFR</b>	Receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral.
<b><i>Tnfsf12</i><sup>-/-</sup></b>	Ratones deficientes en TWEAK o miembro 12 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral.
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TRAF</b>	Factor asociado al receptor de TNF.
<b>TWEAK</b>	Factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.
<b>rCD163</b>	CD163 murino recombinante.
<b>rTWEAK</b>	TWEAK humano recombinante.
<b>rTW</b>	TWEAK murino recombinante.
<b>VCAM</b>	Proteína de adhesión celular vascular.
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento de endotelio vascular.
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad.
<b>18S</b>	ARN ribosómico 18S.

# ***INTRODUCCIÓN***

## Introducción

### 1. El sistema cardiovascular.

El sistema cardiovascular o aparato circulatorio está compuesto principalmente por el corazón y por una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que se encargan del aporte de oxígeno y nutrientes a todas las partes del organismo. Es el primero de los sistemas que se forma durante la embriogénesis de vertebrados y tiene un papel fundamental como encargado del mantenimiento de la homeostasis corporal (Betts et al., 2017).

#### 1.1. Estructura de las arterias.

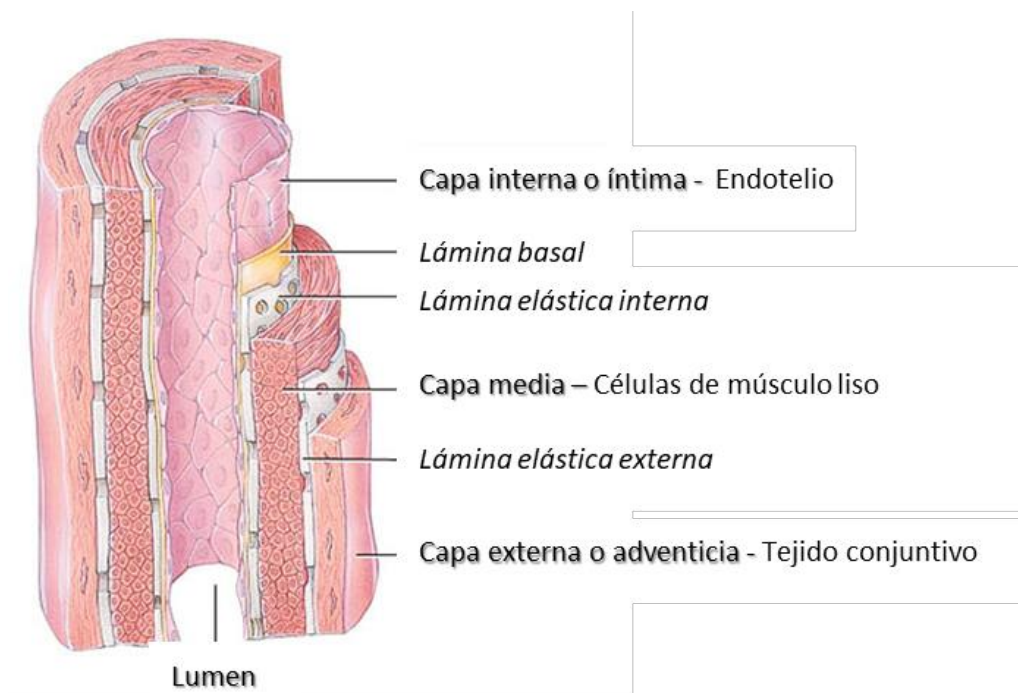
Las arterias se encargan de transportar la sangre oxigenada desde el corazón hasta el resto del cuerpo a excepción de la arteria pulmonar que realiza este intercambio de manera inversa. En función de su estructura y calibre se distinguen arterias de tipo elástico (la aorta y las arterias próximas al corazón) y de tipo muscular (la mayoría de las arterias, como por ejemplo la femoral). Estos vasos son esenciales para mantener el tono vascular ya que regulan los cambios de presión y flujo sanguíneo gracias a su naturaleza contráctil y a las propiedades mecánicas que le confiere su pared (elasticidad, rigidez a la tracción y comprensibilidad).

La pared arterial está formada por tres capas concéntricas e independientes que componen una estructura organizada que garantizan la integridad y funcionalidad de los vasos (Libby et al., 2011) (Fig. 1):

1. **Capa interna o íntima:** Es la capa más cercana al lumen del vaso y está compuesta por una monocapa de células endoteliales que revisten la superficie interna del vaso y se encuentran interconectadas y adheridas a una lámina basal que las separa de la capa media. Se encuentra también una capa subendotelial constituida por tejido conjuntivo disperso.
2. **Capa media:** Delimitada por ambas capas de lámina elástica; una interna y otra externa, entre las cuales se encuentran las células de músculo liso vascular (CMLV) dispuestas circularmente al vaso. El calibre de la arteria depende del número de hileras de CMLV residentes que formen esta capa media. Las CMLV son células metabólicamente muy activas, responsables de la síntesis de la matriz extracelular y de la naturaleza contráctil del vaso.
3. **Capa externa o adventicia:** Es la capa exterior del vaso formada por una red de tejido conjuntivo compuesto principalmente por fibroblastos y componentes estructurales de la matriz extracelular (MEC) como fibras de colágeno y elastina que se encargan de mantener la

integridad estructural del vaso. Se encuentran también presentes vasos sanguíneos (*vasa vasorum*), linfáticos y nervios (*nervi vasorum*), así como células inmunes residentes.

La distribución de estos componentes, así como el calibre del vaso varía entre ambos tipos de arterias. De esta manera las arterias elásticas con naturaleza más contráctil son las de gran calibre y presentan una mayor proporción de láminas elásticas sobre las que se sustentan varias capas de CMLV. Y las de tipo muscular, lo constituyen las arterias medianas y pequeñas formadas esencialmente por una capa compacta de células musculares y una fina lamina elástica (Betts et al., 2017; Latham et al., 1985).



**Figura 1: Esquema representativo de la estructura y capas de la pared arterial.** La pared del vaso está formada por tres capas concéntricas (íntima, media y adventicia) y consta de múltiples células, incluidas células endoteliales, CMLV, fibroblastos y componentes estructurales de la MEC, como elastina y colágeno.

### 1.2. Aorta.

La arteria aorta es la principal arteria del sistema vascular con una naturaleza elástica y extensible. Tiene su origen en el corazón, en el ventrículo izquierdo a nivel de la válvula aórtica, se extiende a lo largo del cuerpo y se encarga de transportar y distribuir la sangre oxigenada desde el corazón al resto del organismo, por lo que se divide en múltiples ramas que se dirigen hacia la parte superior e inferior del cuerpo (Betts et al., 2017).

Está dividida anatómicamente en:

1. Aorta Ascendente: Es el primer tramo de la aorta y abarca desde su nacimiento en la base del ventrículo izquierdo ascendiendo hasta el inicio del cayado aórtico. En su inicio existe una convexidad donde se localizan los senos aórticos que controla la unidireccionalidad de la sangre.
2. Cayado aórtico: Presenta forma de u invertida que da origen a tres ramificaciones importantes (tronco braquiocefálico, arteria carótida y subclavia).
3. Aorta Descendente: Comprende desde el cayado aórtico y desciende a lo largo del tronco hasta las arterias ilíacas y se divide a su vez en dos partes:
  - Aorta torácica: Tramo de aorta descendente que se encuentra sobre el diafragma y que se extiende desde el cayado aórtico.
  - Aorta abdominal: Porción que va desde el diafragma a la ramificación de las arterias ilíacas.

### 1.3. Homeostasis del sistema cardiovascular.

El correcto funcionamiento del sistema cardiovascular es fundamental para la homeostasis corporal. Depende de una compleja red de interacciones a nivel mecánico y celular entre las propias células de la pared vascular (células endoteliales, CMLV y fibroblastos) y los componentes tanto celulares como bioquímicos del torrente circulatorio (Heeneman et al., 2007). En condiciones normales, las CMLV que conforman la capa media se encuentran quiescentes, con un fenotipo contráctil que regula el diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilatación y vasoconstricción) y el flujo sanguíneo (Schaper & Ito, 1996; Wolf et al., 1998). Sin embargo, en condiciones de daño o reparación fisiológica del tejido se induce un cambio en el fenotipo de las CMLV, que pasan de tener un fenotipo contráctil a adoptar un fenotipo sintético, migratorio y proliferativo para facilitar la reparación (Yoshida & Owens, 2005). En esta respuesta participan otros tipos celulares, e implica la integración de un gran número de estímulos, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), o la angiotensina II (AngII), entre otros (Louis & Zahradka, 2010). Estos cambios fenotípicos pueden ser reversibles tras la reparación por lo que las CMLV son capaces de retomar su fenotipo contráctil. Sin embargo si el daño es crónico debido a un mantenimiento de las señales proliferativas en el microambiente celular, los cambios de las CMLV son irreversibles, desencadenando lesiones de la capa íntima y por tanto fenómenos de remodelado vascular (Ridley et al., 2003; Schaper & Ito, 1996; Wolf et al., 1998).

### 2. Remodelado vascular.

El remodelado vascular se refiere a cualquier cambio estructural y funcional en la pared de los vasos sanguíneos. La pared del vaso está continuamente expuesta a estímulos mecánicos, hemodinámicos y neurohumorales locales como pueden ser cambios incontrolados de presión arterial, procesos de respuesta inflamatoria, daños mecánicos de los vasos, acumulación de lípidos, etc. que provocan estas respuestas adaptativas y funcionales. A nivel tisular, estas respuestas se reflejan mediante modificaciones en el diámetro luminal, el grosor de la pared y de la estructura de las áreas transversales de la media y/o adventicia (Berk, 2001; Korner et al., 1997).

El remodelado es un proceso activo que implica cambios en el estatus proliferativo y migratorio de las CMLV, disfunción endotelial, procesos inflamatorios así como síntesis o degradación de los componentes de la matriz extracelular (Heusch et al., 2014). Todos estos procesos están regulados por la interacción dinámica de factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos que desencadenan esta serie de cambios en la estructura y funcionalidad de la pared vascular (Epstein et al., 1994; Renna et al., 2013). Estos cambios patológicos en la estructura y composición de los vasos sanguíneos, si se mantienen durante un tiempo prolongado, pueden contribuir a la fisiopatología de las enfermedades vasculares y trastornos circulatorios causando manifestaciones clínicas (Dzau et al., 2002).

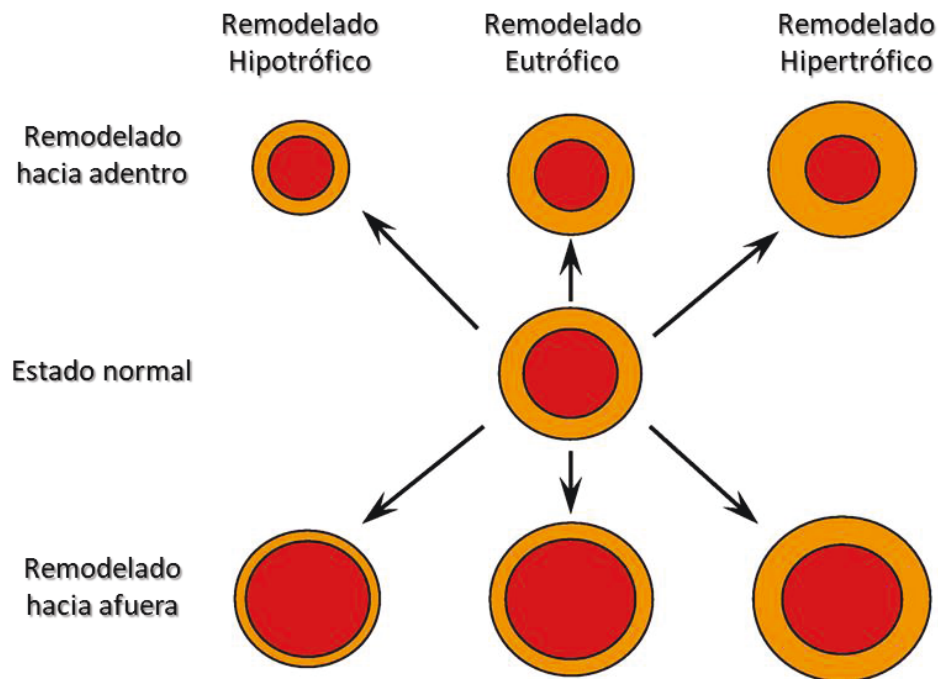
Las enfermedades cardiovasculares representan aproximadamente el 50% y el 25% de las muertes en los países desarrollados y en desarrollo, respectivamente, por lo que son la principal causa de mortalidad total a nivel mundial (Moran et al., 2014). Entre las distintas enfermedades cardiovasculares se encuentran la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis postangioplastia, estenosis del injerto venoso y el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales (AAA), todas ellas comparten la característica fundamental del remodelado patológico de la pared vascular (Ward et al., 2000).

#### 2.1. Tipos de remodelado vascular: Clasificación.

Mulvany propuso que el remodelado vascular debería abarcar cualquier cambio en el diámetro observado en un vaso completamente relajado debido a factores estructurales y que no se explique por cambios en la presión transmural o distensibilidad (Mulvany, 1998). Así, el remodelado se ha clasificado en varias categorías en función de las alteraciones en el tamaño del lumen y de la capa media. Por un lado, se clasifica en **interno o hacia adentro** cuando disminuye el diámetro de la luz del lumen y **externo o hacia afuera** cuando aumenta el diámetro de la luz del lumen.

Así mismo, el remodelado se puede subclasificar dependiendo de si existen variaciones en la cantidad o características de la masa celular de la capa media. En el caso de que no se produzcan

cambios se denomina remodelado eutrófico. Cuando se produce un aumento de la capa media tendríamos un remodelado hipertrófico y, en cambio, cuando encontramos una disminución en el tamaño de la capa media tendríamos un remodelado hipotrófico (Fig. 2).



**Figura 2: Representación esquemática de la clasificación de los distintos tipos de remodelado.** El remodelado vascular puede clasificarse según lo propuesto por Mulvany en función de la naturaleza de los cambios en el diámetro de los vasos (hacia adentro o hacia afuera) y por los cambios en la masa: aumentado (hipertrófico), disminuido (hipotrófico) y sin cambios (eutróficos).

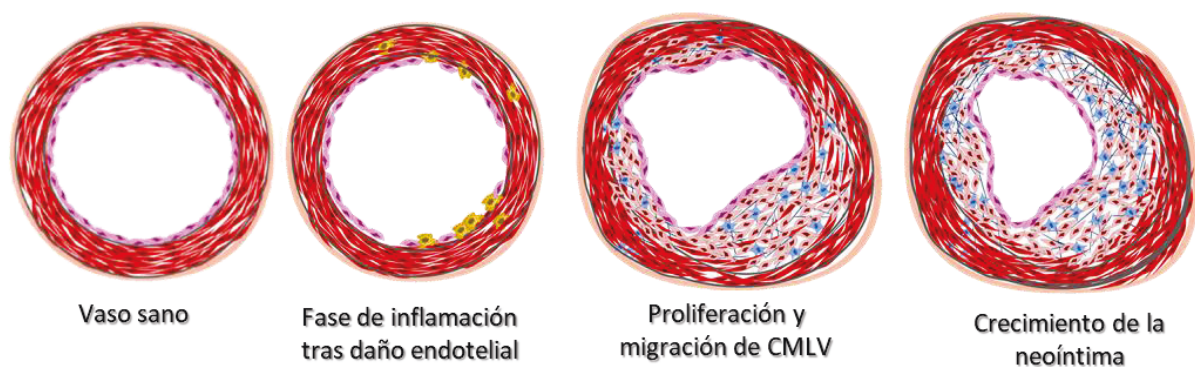
En esta tesis doctoral estudiaremos dos patologías vasculares que implican remodelado vascular hipertrófico hacia adentro, como son la aterosclerosis y la reestenosis post-angioplastia.

### 2.1.1 Formación de neoíntima (o hiperplasia de la íntima).

La hiperplasia de la íntima se refiere a la remodelación vascular patológica en respuesta a un daño de la pared del vaso, especialmente del endotelio, que da lugar a un estrechamiento del lumen debido a la producción masiva de elementos de la matriz extracelular y a la proliferación y migración de CMLV que producen un aumento de células en la íntima (Newby & Zaltsman, 2000).

Durante el proceso de formación de neoíntima, se produce inicialmente la denudación de la capa endotelial debido a la lesión vascular, que puede ocurrir como consecuencia de un estiramiento de la pared durante la angioplastia con balón, la manipulación vascular durante la endarterectomía carotídea o la implantación de un injerto venoso (Bonatti et al., 2005). Esta disfunción endotelial conduce a la activación del endotelio que propicia la interacción de las plaquetas con las células endoteliales activadas dando lugar a la formación de trombos ricos en plaquetas. A continuación, se

produce una cascada inflamatoria en el sitio de la lesión que da lugar al infiltrado de leucocitos en el trombo subendotelial y al reclutamiento y migración de monocitos (Pashova et al., 2020; Renna et al., 2013). Esta respuesta inflamatoria conduce a la activación de las CMLV residentes en la media que van a proliferar y migrar a la capa íntima del sitio de la lesión vascular, donde se acumulan y pasan de un fenotipo contráctil a uno sintético, encargado de secretar citoquinas proinflamatorias, proteinasas, factores de crecimiento y abundantes proteínas de la matriz extracelular para formar la neoíntima (Chaabane et al., 2013; Libby & Hansson, 2015). Con el tiempo, la capa neoíntima se va ensanchando y se va estrechando la luz del lumen en un proceso dinámico de hiperplasia y proliferación de las CMLV, asociado con la producción y depósito de proteínas de la matriz extracelular dando lugar a la oclusión del vaso (Fig. 3)(McMonagle, 2020).



**Figura 3: Esquema representativo de la hiperplasia de la íntima.** La hiperplasia de la íntima empieza como una respuesta al daño de la pared del vaso. Se produce una disfunción endotelial que va a iniciar un reclutamiento y respuesta inflamatoria. Esta inflamación promueve el remodelado de la MEC y la proliferación y migración de CMLV de la capa media a la íntima. La neoíntima continúa creciendo, reduciéndose así el tamaño del lumen y pudiéndose producir la oclusión del vaso.

### 2.1.2 Aterosclerosis.

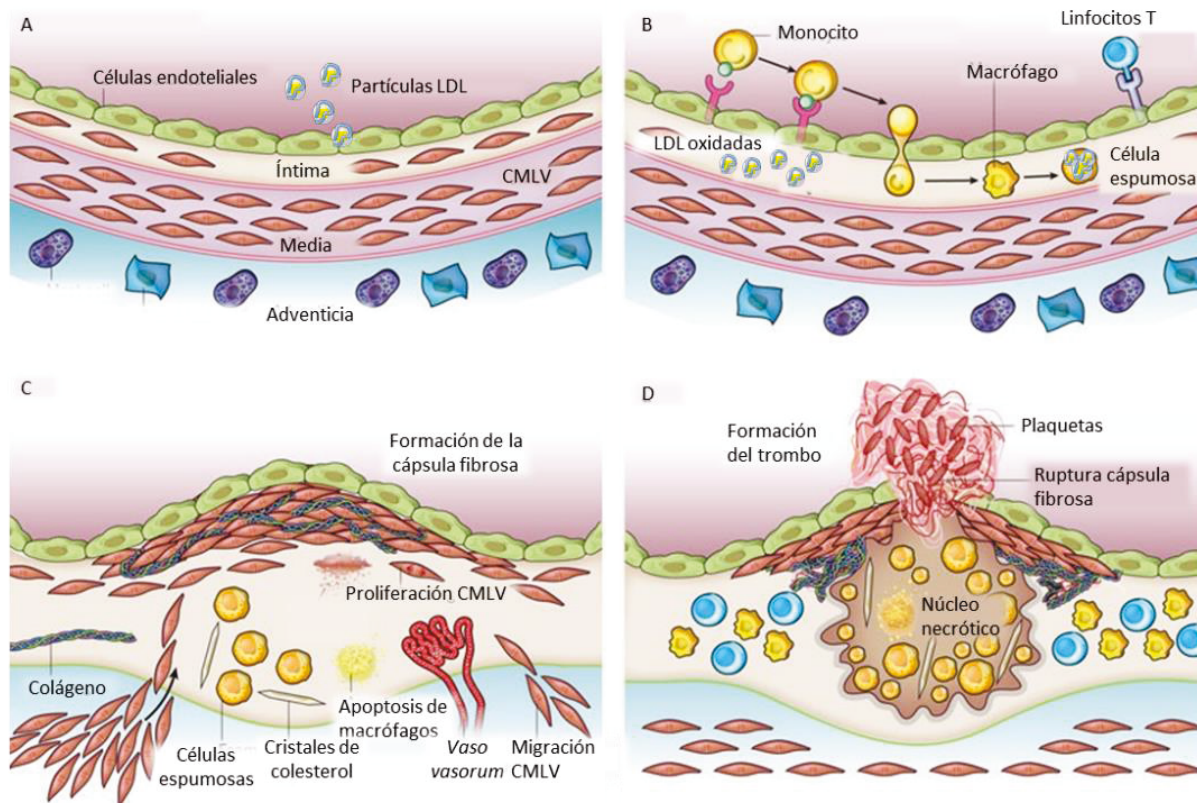
La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos y material fibroso en la capa íntima de la pared arterial, formándose así la placa de ateroma que durante su progresión puede llegar a romperse y producir un trombo que puede dar lugar a un evento isquémico agudo (Libby et al., 2019). La aterosclerosis se considera la mayor causa de muerte en países desarrollados y es la patología subyacente más común en las enfermedades de las arterias coronarias, periféricas y de la enfermedad cerebrovascular (Gallino et al., 2014). Existen diferentes factores de riesgo que pueden favorecer la aparición de lesiones ateroscleróticas en los vasos como son la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia y/o el tabaquismo.

El inicio de la lesión vascular empieza con la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan el colesterol a través de la sangre al espacio subendotelial de las arterias, entre el endotelio y la membrana basal. Estas partículas sufren modificaciones, oxidándose y transformándose



en lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) que desencadenan la activación del endotelio vascular (Skålén et al., 2002). El endotelio activado comienza a sobreexpresar moléculas de adhesión en su membrana, como moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1), selectinas (E-selectina y P-selectina), y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) al igual que proteínas quimiotácticas (proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)). Estas moléculas de membrana favorecen la interacción de los monocitos, linfocitos T y neutrófilos circulantes con el endotelio activado que posteriormente transmigrarán al espacio subendotelial desencadenando la respuesta inflamatoria (Mestas & Ley, 2008). Una vez en la íntima, los monocitos se diferencian en macrófagos que expresan receptores basureros o *scavengers* (CD36, SRA-1, CD204 etc.), encargados de la captación de LDLox acumuladas en la íntima, transformándose así en células espumosas cargadas de lípidos que van a dar lugar a la formación de la estría grasa (Hansson & Hermansson, 2011).

Durante la progresión de la placa de ateroma, continua la captación y acumulación de lípidos extracelulares por parte de los macrófagos, hasta que estos no son capaces de metabolizar más y sufren apoptosis acumulándose en los “núcleos necróticos” ricos en cristales de colesterol (Martinet et al., 2011). Además, las CMLV de la túnica media migran y proliferan hacia la íntima en respuesta a quimioquinas y citoquinas secretadas por las células inflamatorias y endoteliales (Glass & Witztum, 2001a). A su vez aumenta la respuesta inflamatoria, con un incremento del reclutamiento de leucocitos que se ven atraídos por los mediadores proinflamatorios que secretan las CMLV activadas y las células espumosas, cronificando la inflamación y el desarrollo de la placa de aterosclerosis. Según progresa la lesión, las CMLV continúan proliferando y empiezan a sintetizar moléculas de la matriz extracelular (colágeno intersticial, elastina, proteoglicanos y glicoaminoácidos) formando la “capa fibrosa” que va a conferir resistencia a la rotura a la placa de ateroma. Sin embargo, también se produce la secreción de proteasas (por ejemplo, metaloproteinasas (MMP)) que pueden promover la desestabilización de esta cápsula fibrosa (Bennett et al., 2016). Cuando la placa de ateroma está muy avanzada, con un núcleo necrótico de gran tamaño, un alto contenido inflamatorio y una cápsula fibrosa debilitada, es más propensa a la rotura (Stefanadis et al., 2017). En caso de rotura, se produce la formación de un trombo sanguíneo que podría ocluir la arteria limitando la circulación del flujo sanguíneo y pudiendo causar un infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular o enfermedad vascular periférica (Fig. 4) (FERENCE et al., 2017; Finn et al., 2010; Libby et al., 2011).



**Figura 4: Inicio y progresión de la formación de la placa de ateroma.** Esquema representativo del inicio de la formación de la placa de ateroma (A-B) con la presencia de partículas de LDL en el torrente sanguíneo, que se van a acumular en el espacio subendotelial. Allí, se modifican y van a activar el endotelio que va a expresar moléculas de adhesión en su membrana favoreciendo la interacción de monocitos, linfocitos T etc. Los monocitos extravasados maduran a macrófagos capaces de captar las LDL oxidadas convirtiéndose en células espumosas. Durante la progresión de la placa de ateroma (C-D) continua la captación y acumulación de lípidos por parte de las células espumosas, que finalmente acaban sufriendo apoptosis formando los núcleos necróticos ricos en cristales de colesterol. A su vez las CMLV de la media migran hacia la íntima y proliferan formando la cápsula fibrosa rica en depósitos de colágeno. La placa de ateroma acaba desestabilizándose, dando lugar a la rotura de la cápsula fibrosa y a la formación de un trombo sanguíneo que puede llegar a impedir el flujo sanguíneo. Figura modificada de Libby et, al 2011.

En la aterosclerosis destaca el papel del sistema inmune, siendo la acumulación de macrófagos en la pared del vaso uno de los eventos más importantes (Hilgendorf et al., 2015; Moore et al., 2013). Los macrófagos son células clave en el desarrollo de la aterosclerosis, influyendo la cantidad y el fenotipo de los mismos que se encuentran en el interior de la placa en la progresión y/o regresión de la enfermedad. En los últimos años se ha caracterizado distintas subpoblaciones de macrófagos dentro de la lesión vascular, entre ellos los macrófagos pro-inflamatorios o tipo 1 (activados por la vía clásica; M1) y los macrófagos anti-inflamatorios o tipo 2 (activados por la vía alternativa; M2) (Gordon & Taylor, 2005). Los macrófagos M1 tiene una gran actividad antimicrobiana y antitumoral y se caracterizan por mantener y potenciar la respuesta inflamatoria que promueve el daño tisular mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina

6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). En contraposición, los macrófagos M2 promueven la reparación de tejidos disminuyendo la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). A su vez, los macrófagos M2 presentan un alto número de receptores *scavenger* en su membrana que favorecen su potente capacidad fagocítica, eliminando desechos y células apoptóticas (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Los macrófagos son un grupo heterogéneo con una gran plasticidad, tanto el fenotipo como sus funciones pueden cambiar en respuesta al microambiente circundante (Khallou-Laschet et al., 2010; Murray, 2017). A parte de los macrófagos M1/M2, se ha demostrado la existencia de otros fenotipos de macrófagos en las placas de ateroma que ejercen diferentes funciones (Mosser & Edwards, 2008; Stöger et al., 2012).

## 2.2. Tratamiento y modelos de estudio de las patologías de remodelado vascular. Angioplastia como tratamiento y reestenosis.

La aterosclerosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial a pesar de las mejoras en el control farmacológico de los factores de riesgo (niveles altos de colesterol, hipertensión, diabetes, sobrepeso u obesidad, etc.) que permiten retrasar el crecimiento de las lesiones. Hoy en día se utiliza como tratamiento quirúrgico principalmente la angioplastia con balón, con o sin colocación de endoprótesis vascular (stent), para abrir las arterias obstruidas y normalizar el flujo sanguíneo ensanchando el diámetro del lumen (Jukema et al., 2012). Otras intervenciones quirúrgicas son la endarterectomía, la implantación de un injerto venoso o cirugía de bypass. Sin embargo, a pesar de los beneficios a corto plazo, estas intervenciones pueden fallar debido a una hiperplasia de la neoíntima denominada reestenosis que se produce tras la intervención quirúrgica. Esta reestenosis vascular provocará un nuevo episodio de estrechamiento del vaso sanguíneo que es consecuencia de una respuesta de curación de la pared arterial ante el daño mecánico de la intervención quirúrgica. A nivel celular hay una proliferación y migración acelerada de las CMLV junto con una disminución de la apoptosis que conduce a un nuevo estrechamiento de la arteria (Chaabane et al., 2013; Schwartz, 1997). Esta hiperplasia de la neoíntima se considera la principal causa de reestenosis vascular tanto a medio como a largo plazo, complicando entre el 30% y el 50% de las intervenciones vasculares. Actualmente, se intenta controlar esta reestenosis y formación de hiperplasia de la íntima mediante el uso de stents liberadores de fármacos inmunosupresores y antiproliferativos que se centran en inhibir la proliferación de las CMLV, retardando el crecimiento de la neoíntima en la zona donde se han colocado. Con el uso de stents se ha conseguido reducir tanto la frecuencia como la extensión de la hiperplasia de la íntima. Sin embargo, la reestenosis intra-stent todavía se produce en el 10% de los casos y sigue siendo un problema clínico que se necesita resolver (Iakovou et al., 2005; Pashova et al., 2020; Waseda et al., 2009).

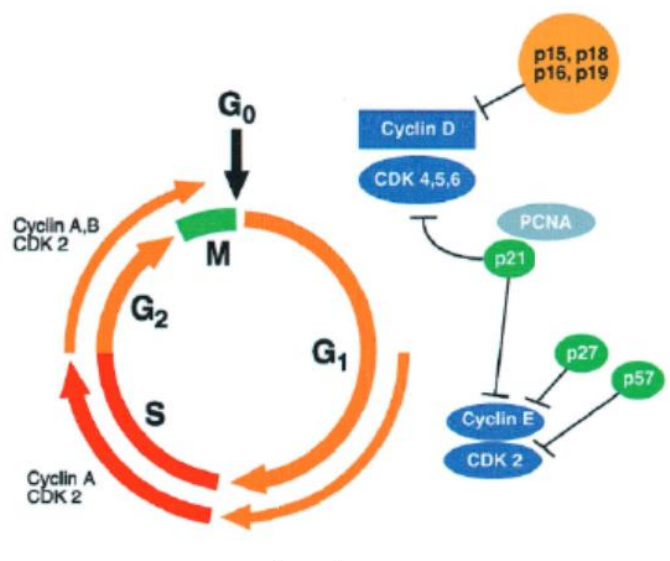
El desarrollo de modelos animales de enfermedades cardiovasculares, incluidas las enfermedades aterotrombóticas y cardíacas, ha contribuido a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de estas patologías ofreciendo nuevos enfoques y estrategias terapéuticas. Gracias a los distintos modelos se puede estudiar y abordar las complicaciones cardiovasculares recreando estas patologías humanas en diferentes especies animales. En este caso, los modelos de ratón han demostrado ser útiles para estudiar el desarrollo y la progresión de la lesión aterosclerótica (Egido et al., 2011; Getz & Reardon, 2012). En 1992 se generó el ratón deficiente para la Apolipoproteína E (ApoE) en el que se describieron lesiones similares a las de los humanos (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). El ratón *ApoE*<sup>-/-</sup> se utiliza como modelo de desarrollo de placas de ateroma, ya que muestra predisposición a sufrir hiperlipidemia con niveles plasmáticos elevados de colesterol, principalmente de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL, y con un desarrollo espontáneo de lesiones ateroscleróticas (Nakashima et al., 1994). Estas lesiones se ven aceleradas cuando los ratones son alimentados con dieta grasa rica en colesterol, provocando un aumento en las concentraciones plasmáticas de colesterol (Zhang et al., 1994). Además, estos ratones desarrollan placas de ateroma principalmente en la raíz aórtica, seguido por el arco aórtico, el tronco braquiocefálico, la carótida izquierda y las arterias subclavia y coronaria (Hu et al., 2005). Sin embargo, una limitación importante del modelo de ratón *ApoE*<sup>-/-</sup> es la poca frecuencia de rotura de placa y trombosis, siendo lesiones más estables en comparación con las humanas (Emini Veseli et al., 2017).

Los modelos animales de lesión arterial son fundamentales para estudiar los mecanismos celulares que subyacen al desarrollo de la hiperplasia y reestenosis de la íntima. En el caso de los modelos de ratón que mimetizan la hiperplasia de la íntima, se les realiza una denudación del endotelio para dañar la pared del vaso de la arteria femoral o carótida mediante la introducción de una guía de angioplastia para recrear el daño que ocurre en humanos (Roque et al., 2000). En este caso, tras la lesión con guía de angioplastia de la arteria del ratón se induce la formación de abundante hiperplasia de la íntima a las 2 y 4 semanas, provocando la rápida acumulación de leucocitos y moléculas de adhesión en la superficie luminal denudada. Este modelo es una herramienta valiosa para estudiar la lesión arterial en modelos de ratón modificados genéticamente.

### 2.3 Ciclo celular y CMLV en el remodelado vascular.

El remodelado vascular, como se ha indicado anteriormente, supone entre otros procesos celulares la proliferación de CMLV de la capa media para la formación de la neoíntima. El ciclo celular por el cual las células crecen y se dividen está formado por cuatro fases: G0/G1, S, G2 y M. Inicialmente, las células se encuentran inactivas en fase G0, al entrar en división comienza la fase G1 donde se van a ensamblar los factores necesarios para la replicación del ADN necesarios para la fase de síntesis (S). Una vez que se completa la replicación del ADN, las células entran en la interfase (G2) que es una

preparación para la mitosis (M). Existen puntos de control en las interfases G<sub>1</sub>-S y G<sub>2</sub>-M para asegurar una correcta y ordenada progresión del ciclo celular (Elledge, 1996). Las fases del ciclo celular están coordinadas por quinasas dependientes de ciclina (CDK) que forman holoenzimas con sus subunidades reguladoras, las ciclinas (Koepp et al., 1999). La actividad de los complejos ciclina-CDK dependen del estado de fosforilación de las CDK y del nivel de expresión de las ciclinas y son específicos de cada fase permitiendo una progresión adecuada a través del ciclo celular. Inicialmente, el aumento de complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2, en cooperación con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), coordina la replicación del ADN regulando la transición a través de las fases G<sub>1</sub> y S (C. J. Sherr, 1995). La subsiguiente transición G<sub>2</sub>-M está regulada por complejos ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK1. Además de estos complejos, la progresión del ciclo celular está regulada por inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKI) que se unen a los complejos ciclina-CDK y evitan su activación (Dzau et al., 2002; Charles J. Sherr & Roberts, 2004). Existen dos grupos predominantes de CKI; la familia de proteínas inhibidoras de CDK (CIP/KIP) que se unen a una gran cantidad de complejos ciclina-CDK, y que incluye p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> y p57<sup>KIP2</sup>, y la familia INK4 que incluye p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> y p19<sup>INK4D</sup>, los cuales inhiben de forma específica la actividad de CDK4 y CDK6 (Fig. 5) (Hannon & Beach, 1994; Nabel, 2002).



**Figura 5: El ciclo celular y sus reguladores (ciclina/CDK y CKI).** El ciclo celular está dividido en las fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. La correcta progresión por las distintas fases está modulada por el equilibrio entre los reguladores positivos del ciclo celular (complejos ciclina-CDK) y los reguladores negativos (CKI) que evitan su activación. Figura modificada de Boehm & Nabel, 2001.

El ciclo celular es clave en la proliferación de las CMLV y por tanto en el remodelado vascular (Boehm & Nabel, 2001). En condiciones normales, las CMLV que forman la capa media de las arterias se encuentran con un fenotipo quiescente o inactivas (fase G<sub>0</sub>) con una tasa de proliferación muy baja. Sin embargo, una vez que se produce una lesión, existe un desequilibrio entre los factores de

crecimiento (PDGF), las citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y los factores inhibidores que inducen a la activación de CMLV, que van a pasar de un fenotipo contráctil quiescente a uno sintético (Chang & Ong, 2005). Una vez activadas, las CMLV salen de la etapa inactiva G0 y entran en el ciclo de división progresando a través de las transiciones G1 y G1/S (Nabel, 2002). Estos estímulos mitógenos que inducen la entrada en el ciclo celular señalizan a través de distintas vías de señalización. Entre otras, destaca la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en la que se incluye la cascada de quinasas reguladas por señales extracelulares de tipo 1 y 2 (ERK1/2), que preferencialmente regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Por otra parte, se encuentra la vía de señalización celular dependiente de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt que regula el crecimiento, supervivencia y migración celular (Mendoza et al., 2011; Seger & Krebs, 1995).

Con una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de las enfermedades vasculares proliferativas y de las interacciones ciclina-CDK-CKI se pueden diseñar estrategias de tratamiento que inhiban o bloqueen los procesos de proliferación vascular. Hasta ahora, la aplicación terapéutica de la inhibición del ciclo celular se ha limitado a la reestenosis intra-stent y a situaciones de fallo de injerto, ya que estas enfermedades se caracterizan por tener una proliferación de las CMLV aumentada, siendo la base principal de estos trastornos (Chaabane et al., 2013; Libby & Hansson, 2015).

### 3. La superfamilia del Factor de Necrosis tumoral (TNF).

Las citoquinas son un gran grupo de proteínas, tanto solubles como asociadas a la membrana plasmática, que se unen a receptores de membrana y actúan en numerosos procesos biológicos, como inflamación, respuesta inmune, reparación del daño tisular, entre otros (Foster et al., 2004). La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) está formada por un subgrupo de citoquinas y receptores con un gran interés e importancia durante el remodelado vascular debido a su enorme potencial como dianas terapéuticas. Los ligandos de la superfamilia del TNF se expresan principalmente como proteínas transmembrana de tipo II (con el dominio C-terminal en el espacio extracelular). Estos ligandos comparten un motivo estructural común llamado dominio de homología de TNF (DHT), que se une a dominios ricos en cisteína (DRC) de los receptores del TNF (Bodmer et al., 2002). Además, los ligandos pueden procesarse mediante proteasas como citoquinas solubles cuando se corta su dominio extracelular sin perder su actividad biológica. La superfamilia de proteínas del TNF se unen a uno o más miembros de la superfamilia de receptores del TNF (TNFR) que son principalmente proteínas transmembrana de tipo I (en ocasiones de tipo III). A su vez, estos receptores pueden secretarse como proteínas solubles debido a un procesamiento proteolítico o *splicing* alternativo del exón que codifica el dominio transmembrana (CA et al., 1994; Locksley et al., 2001).

El inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) y su único receptor funcional, el factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14 (Fn14) son dos miembros de la



superfamilia del TNF que participa en múltiples actividades biológicas que incluyen proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis e inflamación (Winkles, 2008). Todos estos procesos están estrechamente relacionados en el remodelado vascular patológico y es por tanto el tema de interés de esta tesis doctoral.

### 3.1 TWEAK y sus receptores Fn14 y CD163.

En 1997 se describió por primera vez la citoquina TWEAK (Apo3L, *Tnfsf12*) como un nuevo miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF) (Chicheportiche et al., 1997). El gen TWEAK humano está ubicado en la posición del cromosoma 17p13.1 y codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 249 aminoácidos (aa) de 30 kilodaltons (kDa) (Fig. 6A). El dominio extracelular C-terminal de esta proteína contiene el sitio de unión al receptor y, como otros miembros de la superfamilia del TNF, también tiene un motivo de secuencia consenso para su corte por la furina (Campbell et al., 2004; Wiley & Winkles, 2003). La región N-terminal contiene un anclaje hidrofóbico que permite su inserción en la membrana celular. La mayoría de las células expresan dos isoformas de TWEAK. Inicialmente TWEAK se sintetiza como una proteína unida a membrana (mTWEAK) de 30 KDa que puede procesarse rápidamente en un fragmento soluble (sTWEAK) de 18 KDa por la acción proteolítica de la furina. Esta isoforma soluble de TWEAK está formada básicamente por la región C-terminal con el subdominio de unión al receptor y es la que media las diferentes propiedades biológicas de esta proteína (Fig. 6A).

TWEAK se expresa de forma ubicua en numerosos tejidos alcanzando niveles altos en el corazón, el tejido vascular, el páncreas, el intestino, el cerebro, los pulmones, los ovarios y el músculo esquelético, y niveles bajos en el hígado y el riñón (Chicheportiche et al., 1997). TWEAK se expresa tanto en la pared de los vasos sanos como patológicos (Muñoz-García et al., 2006). A nivel celular, el ARNm de TWEAK se detecta en varios tipos de células inmunitarias, incluidos macrófagos (Chicheportiche et al., 1997), astrocitos y microglía (Desplat-Jégo et al., 2002), monocitos activados y células T (Kaplan et al., 2002; Nakayama et al., 2000), células dendríticas, células asesinas naturales (NK) (Maecker et al., 2005) y mastocitos (Mendez-Barbero et al., 2020). En este caso, los macrófagos/monocitos son la principal fuente de sTWEAK en los tejidos inflamatorios (Liu et al., 2017). Dentro del sistema cardiovascular TWEAK se expresan en cardiomiocitos (Chorianopoulos et al., 2010; Jain et al., 2009; Mustonen et al., 2010; Novoyatleva et al., 2010), células endoteliales (Wiley et al., 2001) y CMLV (Muñoz-García et al., 2006).

En 1998 el receptor de TWEAK fue identificado erróneamente como el receptor 3 de muerte (DR3) dentro de la superfamilia de receptores del TNF (TNFRSF) (Marsters et al., 1998). No fue hasta el año 2001, cuando el receptor de TWEAK fue clonado e identificado como el factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14 humano (Fn14, *Tnfrsf12a*) (Meighan-Mantha et al., 1999; Wiley et al.,

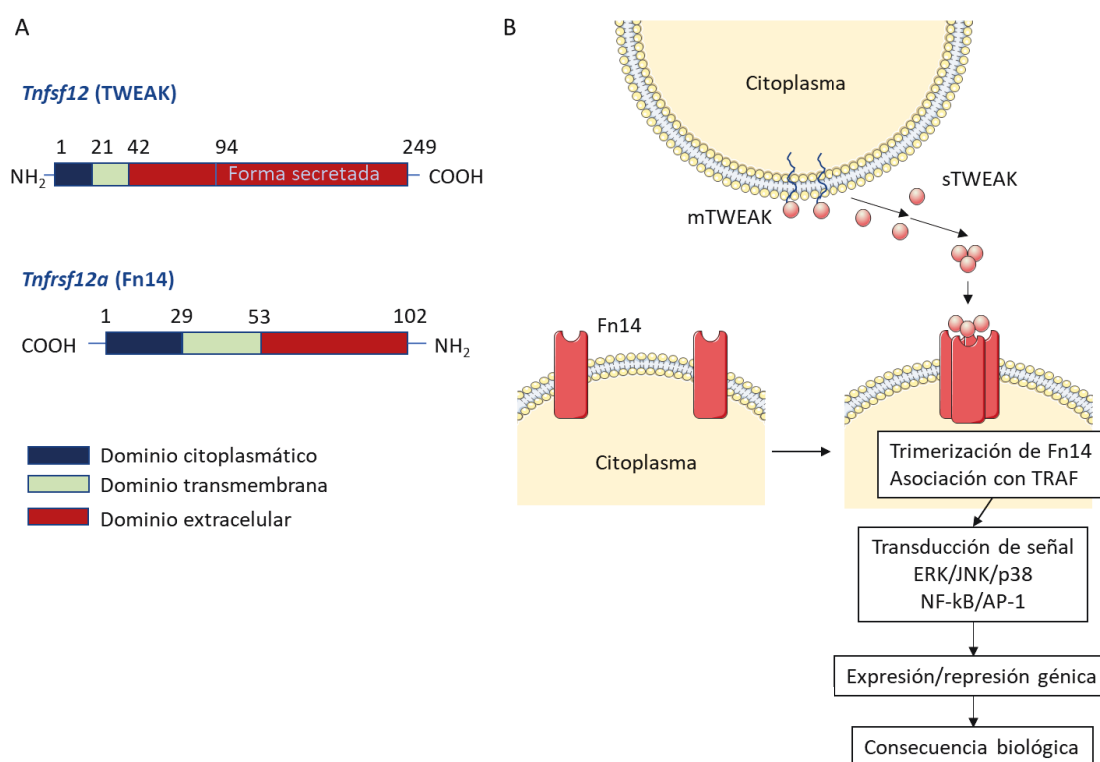
2001). El gen humano *Tnfrsf12a* se encuentra en la posición cromosómica 16p.13.3 y codifica una proteína transmembrana de tipo I de 129 aa y 14 kDa (Fig. 6A) (Wiley et al., 2001). Fn14 se procesa en una proteína madura de 102 aa, siendo el miembro más pequeño de TNFRSF hasta la fecha. El dominio extracelular de Fn14 contiene un único dominio rico en cisteína por donde se va a unir al ligando, siendo este el lugar de unión de TWEAK (Brown et al., 2006). La señalización inducida por los receptores de la superfamilia del TNF implica la presencia de dominios letal en su cola citoplasmática. Sin embargo, la cola citoplasmática de Fn14 es demasiado corta para tener un dominio letal, y contiene en su dominio intracelular un sitio de unión a proteínas TRAF con tres treoninas que se fosforilan para inducir la unión de TRAF y poder transmitir la señalización de TWEAK (Brown et al., 2003). TWEAK trimeriza y se une a los monómeros de Fn14, promoviendo la trimerización del receptor y la transducción de señales (Tran et al., 2005) (Fig. 6B).

Fn14 es altamente inducible en respuesta a múltiples factores de crecimiento y citoquinas en la superficie de células epiteliales (Michaelson et al., 2005), endoteliales (Wiley et al., 2001), CMLV (Muñoz-García et al., 2006) y otros tipos de células mesenquimales (Girgenrath et al., 2006; Perper et al., 2006), neuronas (Tanabe et al., 2003) y astrocitos (Desplat-Jégo et al., 2002). Además, el ARNm de Fn14 se detecta en fibroblastos cardíacos de rata (Chen et al., 2012). Sin embargo, no se ha observado expresión de Fn14 en linfocitos T y B (Burkly et al., 2007). Al contrario que TWEAK, la expresión de Fn14 es relativamente baja o está ausente en el tejido sano, incluidos los vasos y el corazón, aunque se induce alta y rápidamente bajo condiciones patológicas (Muñoz-García et al., 2006). La expresión de Fn14 aumenta por la acción de distintos factores de crecimiento (como PDGF y VEGF), citoquinas proinflamatorias e interleuquinas (como IL-1 $\beta$  e INF- $\alpha$ ), Ang II y  $\alpha$ -trombina en humanos y CMLV aórticas de rata (Muñoz-García et al., 2006; Wiley et al., 2001). Diferentes estudios han mostrado cambios en la expresión de Fn14 en modelos experimentales de diferentes patologías como lesión hepática crónica (Tirnitz-Parker et al., 2010), infarto de miocardio (Mustonen et al., 2010), aterosclerosis (Muñoz-García et al., 2006), fallo renal agudo (Justo et al., 2006) o disfunción cardíaca (Jain et al., 2009), entre otros.

Tanto TWEAK como Fn14 están estrechamente relacionados en humanos y ratones, siendo su homología superior al 90%. De hecho, TWEAK murino puede unirse a Fn14 humano y viceversa (Bossen et al., 2006). Cabe destacar que TWEAK no reacciona de forma cruzada con ningún otro miembro de la superfamilia del TNF o TNFR, siendo su interacción específica con Fn14 (Bossen et al., 2006). La conservación filogenética entre diferentes especies sugiere que el eje TWEAK/Fn14 juega un papel biológico importante por lo que numerosos estudios se han centrado en esta interacción y se han podido generar ratones viables deficientes en TWEAK (*Tnfrsf12<sup>-/-</sup>*) o Fn14 (*Tnfrsf12a<sup>-/-</sup>*) (Zheng & Burkly, 2008).



Finalmente, en 2007 se identificó CD163 como un nuevo receptor de TWEAK (Bover et al., 2007). CD163 es una proteína transmembrana de tipo I de 130 kDa con una cola citoplásmica corta, un solo segmento transmembrana y un gran dominio extracelular que consta de nueve dominios de clase B del receptor eliminador de receptores ricos en cisteína (SRCR) (Law et al., 1993). Se han identificado diferentes isoformas de CD163 en las que varía la longitud de la cola citoplásmica, siendo la isoforma de cola corta la más abundante, y todas ellas presentan actividad endocítica (M. J. Nielsen, 2006). Además, CD163 se puede presentar también de forma soluble, sCD163, encontrándose en el plasma (Holger Jon Møller et al., 2002) y otros fluidos corporales (Sulahian et al., 2001) debido al desprendimiento tanto constitutivo como inducido de la superficie celular. Sin embargo, no se han establecido todavía funciones específicas de sCD163, aunque se ha asociado como un nuevo marcador de estados de baja inflamación característicos de enfermedades como la diabetes, obesidad, aterosclerosis y enfermedad hepática (M. C. Nielsen et al., 2020; Thomsen et al., 2013; Zhi et al., 2017).



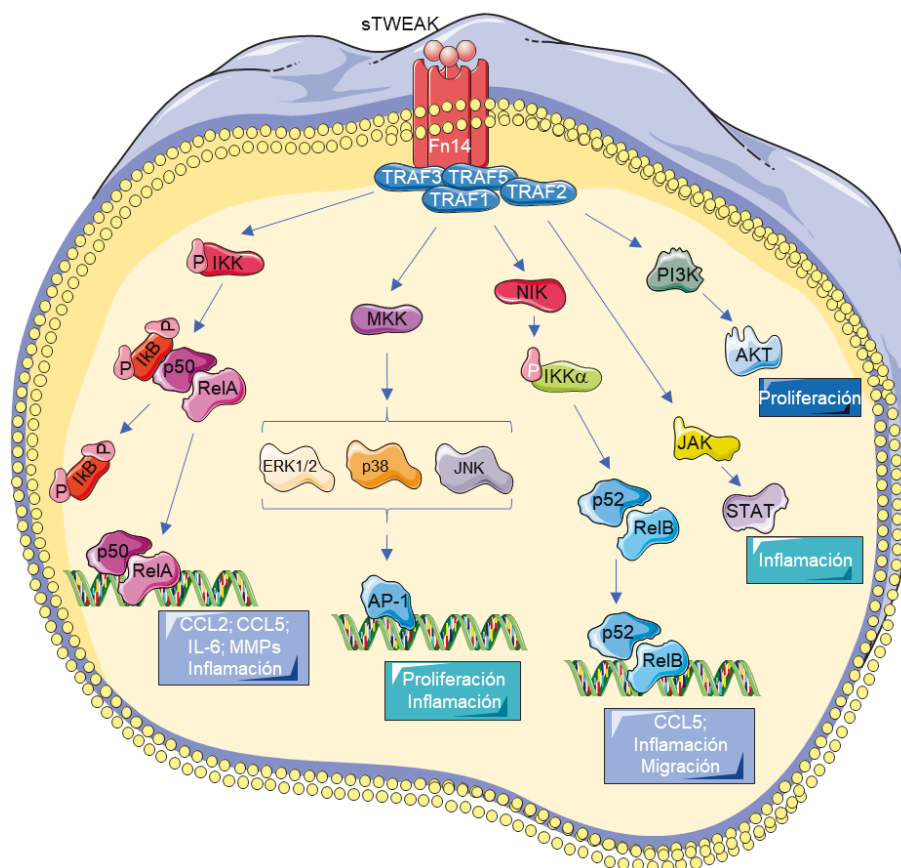
**Figura 6. Estructura de TWEAK y Fn14.** **A)** Representación esquemática de la estructura de TWEAK y de su receptor funcional Fn14 en humano con sus distintos dominios y forma secretada de TWEAK. **B)** TWEAK soluble se une al dominio extracelular del receptor Fn14 y produce su trimerización. Este cambio estructural del receptor desencadena el reclutamiento de proteínas TRAF a su cola citoplásmica y la activación de las diferentes vías que veremos más adelante como NF-kB/AP-1 o ERK/JNK/p38. El aumento de la activación de estas vías de señalización conduce a la regulación de genes diana específicos que regulan diferentes mecanismos biológicos.

CD163 se expresa exclusivamente por monocitos/macrófagos de forma constitutiva y/o inducida por algunos estímulos; viéndose fuertemente inducida por mediadores antiinflamatorios

como la IL-10, e inhibida por mediadores proinflamatorios como el INF- $\gamma$  (Buechler et al., 2000). Esta ampliamente descrito que CD163 es un receptor basurero o *scavenger* encargado de eliminar los complejo hemoglobina/haptoglobina (Hb/Hp) de la circulación sanguínea (Kristiansen et al., 2001a). Los complejos Hb/Hp se unen a los dominios extracelulares de CD163, produciéndose la endocitosis del complejo y su degradación en los lisosomas (Kristiansen et al., 2001a; Rother et al., 2005). Además, CD163 es capaz de unir, internalizar y eliminar TWEAK, siendo por tanto un receptor basurero de TWEAK previniendo así sus efectos biológicos (Moreno et al., 2009). sCD163 puede funcionar como receptor señuelo para TWEAK, observándose una mayor relación sCD163/sTWEAK en pacientes con enfermedad arterial periférica e isquemia aguda en las extremidades (Moreno et al., 2010; Urbonaviciene et al., 2011). Adicionalmente, CD163 interactúa con TWEAK para regular la regeneración tisular después de una lesión isquémica *in vivo* (Akahori et al., 2015). Todavía no se ha explorado la relevancia de la interacción TWEAK/CD163 en el contexto de la enfermedad cardiovascular pero si se ha visto que CD163 tiene un gran potencial en la modulación terapéutica de las enfermedades inflamatorias gracias a sus propiedades antiinflamatorias e inmunoreguladoras (Etzerodt & Moestrup, 2013).

#### 4. Señalización a través del sistema TWEAK-Fn14.

Cuando TWEAK se une al dominio extracelular de Fn14, produce una trimerización del receptor (Bodmer et al., 2002). Esta estructura trimérica de Fn14 induce el reclutamiento de TRAF2 y TRAF5 a través del motivo de unión a TRAF (PIEET) en la cola citoplasmática y conduce a la activación de diferentes vías de señalización (Brown et al., 2003; Han et al., 2003) (Fig. 6B). La unión de TWEAK-Fn14 activa varias vías de señalización como la vía del factor de transcripción nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B), tanto la canónica (p50/p65) como la no canónica (p52/RelB) (Brown et al., 2003; Saitoh et al., 2003), la vía de MAPK (Ando et al., 2006), la vía de PI3K/AKT (Moreno et al., 2013) y la vía de JAK/STAT (Fernández-Laso et al., 2017; Wang et al., 2017), entre otras (Fig. 7). La activación de MAPK inducida por TWEAK ha sido descrita en células endoteliales (Donohue et al., 2003), en la línea celular monocítica Thp-1 (Nakayama et al., 2000) y en cardiomiocitos (Chorianopoulos et al., 2010). Además, TWEAK activa PI3K/AKT en células endoteliales (Moreno et al., 2013). La activación de NF- $\kappa$ B inducida por TWEAK está implicada en la sobreexpresión de múltiples citoquinas en las CMLV, como CCL2 y CCL5, que participan en el reclutamiento de células inflamatorias hacia la pared del vaso dañado (Muñoz-García et al., 2009). TWEAK también activa NF- $\kappa$ B en la línea celular monocítica Thp-1 (Moreno et al., 2013) y en placas ateroscleróticas de ratones deficientes para *ApoE* (Damås et al., 2007). Aunque sTWEAK es el responsable de la respuesta asociada a Fn14, se ha descrito que también mTWEAK puede, de forma yuxtracrina, unirse a células vecinas que tengan Fn14 como receptor de superficie y activar la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Brown et al., 2010).



**Figura 7: Vías de señalización del eje TWEAK/Fn14.** sTWEAK se une al dominio extracelular del receptor Fn14 y produce su trimerización. Este cambio estructural del receptor desencadena el reclutamiento de proteínas TRAF en su cola citoplásmica y la activación de las diferentes vías; NF-κB canónica (p50/RelA) y no canónica (p52 / RelB), MAPK (ERK/JNK/p38 y AP-1), JAK/STAT y PI3K/AKT. El aumento de la activación de estas vías de señalización conduce a la regulación de genes diana específicos del mecanismo biológico.

La interacción TWEAK/Fn14 desencadena funciones celulares fisiopatológicas que dependen del tipo de célula y el microambiente. En este sentido, se ha demostrado previamente que TWEAK participa en diversas patologías que cursan con remodelado cardiovascular, favoreciendo la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis y degradación de la matriz (Blanco-Colio, 2014). Sin embargo, dado que TWEAK tiene efectos beneficiosos o deletéreos según las etapas de la enfermedad, el papel de TWEAK en diferentes situaciones patológicas precisa una mayor caracterización.

## 5. TWEAK y Aterosclerosis.

Desde un punto de vista molecular, el eje TWEAK-Fn14 se ha asociado con las diferentes fases del desarrollo de la placa aterosclerótica. La interacción TWEAK/Fn14 regula la expresión de diferentes moléculas de adhesión, como ICAM-1 y E-selectina, en células endoteliales umbilicales humanas (Harada et al., 2002) y aumenta la secreción de IL-8 y CCL2 por las células endoteliales que van a reclutar predominantemente monocitos y neutrófilos (Blanco-Colio et al., 2007).

Durante la progresión de la lesión aterosclerótica, TWEAK favorece el cambio fenotípico de las CMLV, aumentando la expresión de marcadores sintéticos como la osteopontina y disminuyendo la expresión de genes contráctiles como  $\alpha$ -actina y calponina (Fernández-Laso et al., 2017), por lo que se piensa que TWEAK estaría promoviendo la proliferación y migración de las CMLV, y tanto las CMLV como las células inflamatorias estarían favoreciendo la progresión de la placa aumentando la expresión de citoquinas y MMPs perpetuando así el bucle inflamatorio. Además la activación de NF- $\kappa$ B juega un papel clave en la inflamación vascular en CMLV, macrófagos y células endoteliales de ratón y en las placas ateroscleróticas humanas (Brand et al., 1996; Martín-Ventura et al., 2004). La respuesta inflamatoria inducida por TWEAK se encuentra en parte controlada por NF- $\kappa$ B. En este contexto, estudios de nuestro grupo han demostrado que la inyección sistémica de TWEAK agrava la respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- $\kappa$ B en ratones ateroscleróticos, aumentando el contenido de macrófagos y el tamaño de la placa (Muñoz-García et al., 2009). Además, la delección génica de TWEAK o el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK disminuye el perfil proinflamatorio, disminuyendo la expresión de CCL2 y CCL5 y aumentando las características de estabilidad de la placa en ratones deficientes en *ApoE* (Sastre et al., 2014). Asimismo, TWEAK también regula la inflamación en un modelo de progresión de aterosclerosis en ratones diabéticos deficientes en *ApoE* (Fernández-Laso et al., 2017). Además, experimentos de pérdida de función *in vitro* en CMLV en cultivo o la inhibición *in vivo* de TWEAK por delección génica o intervención farmacológica mostraron que TWEAK regula la expresión de CCL5, CXCL10 e ICAM-1 mediante la fosforilación de STAT-1 (Fernández-Laso et al., 2017).

Aunque las CMLV juegan un papel clave en el desarrollo de las placas ateroscleróticas, los macrófagos son muy importantes durante todo el proceso inflamatorio. Varios estudios han apoyado el papel del eje TWEAK/Fn14 en la biología de monocitos/macrófagos durante la aterosclerosis. De hecho, el bloqueo de la señalización de TWEAK por Fn14-Fc en macrófagos derivados de la médula ósea reduce la captación de lípidos (Schapira et al., 2009). Además, TWEAK induce varios mediadores proinflamatorios de la aterogénesis como IL-6, CCL2 e IL-8 en monocitos activados (Kim et al., 2004). TWEAK también se ha asociado con la secreción de la citoquina de unión al ADN de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) en macrófagos humanos (Moreno et al., 2013). HMGB1 es liberado por células necróticas y macrófagos activados y actúa como mediador durante la inflamación ya que estimula la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión, que desencadenan la respuesta inflamatoria en las placas ateroscleróticas (Kalinina et al., 2004). Nuestro grupo ha demostrado que la inyección sistémica de TWEAK recombinante aumenta la expresión de HMGB1 en placas de ateroma de ratones hiperlipidémicos deficientes en *ApoE*. Además, la expresión de HMGB1 se colocaliza con la expresión de Fn14 en placas ateroscleróticas humanas, especialmente en áreas ricas en macrófagos (Moreno et al., 2013). El eje TWEAK/Fn14 induce la liberación de HMGB1

a través de NF- $\kappa$ B en monocitos, lo que a su vez podría inducir la activación de NF- $\kappa$ B nuevamente, formando un bucle positivo inflamatorio (Moreno et al., 2013).

El estrés oxidativo también está asociado con la inflamación y el desarrollo de la aterosclerosis (Martin-Ventura et al., 2017). El aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se produce en parte por la activación de las NADPH oxidasas (Lassègue & Griendling, 2010). En consecuencia, el exceso de ROS puede desencadenar la secreción de proteasas, lo que facilita la rotura de la capa fibrosa y la trombosis (Lu & Wahl, 2005). En este contexto, experimentos *in vitro* en macrófagos han demostrado que TWEAK y Fn14 participan en la activación de NADPH oxidasa regulando la producción de ROS. Además, altos niveles de expresión de TWEAK y Fn14 en áreas ricas en macrófagos de placas ateroscleróticas humanas, colocalizan con las subunidades asociadas a la membrana de la NADPH oxidasa, p22phox y la isoforma gp91phox (Nox2) (Madrigal-Matute et al., 2015).

En las placas avanzadas, la estabilidad depende de la integridad de la capa fibrosa que recubre el núcleo lipídico. De esta forma las placas estables se caracterizan por una capa fibrosa gruesa con poca inflamación, acumulación de macrófagos y apoptosis. Por el contrario, las placas con grandes núcleos lipídicos están cubiertas por una fina capa fibrosa que es más propensa a romperse. El deterioro de la capa fibrosa depende de la actividad MMP de los macrófagos y las CMLV que degradan el colágeno intersticial (Ketelhuth & Bäck, 2011). TWEAK, y Fn14 se co-expresadas con diferentes MMP en áreas ricas en macrófagos y células espumosas de placas ateroscleróticas humanas (Kim et al., 2001). La activación de Fn14 aumenta MMP-1, -9 y -13 en la línea celular de monocitos humanos Thp-1 (Kim et al., 2001), y TWEAK es capaz de aumentar la actividad de las proteasas MMP-9 y -2 en ratones deficientes en *ApoE* (Sastre et al., 2014). Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK disminuye la actividad de las MMPs en las placas presentes en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> favoreciendo la estabilidad de las placas (Sastre et al., 2014). La activación de las MMP se asocia con la calcificación de la placa, un fenómeno que puede comprometer la estabilidad de las placas (Huang et al., 2001). Se han descrito propiedades procalcificantes de TWEAK en CMLV humanas (Hénaut et al., 2016) y se ha observado como TWEAK aumenta la calcificación vascular en placas ateroscleróticas de ratones deficientes en *ApoE* (Sastre et al., 2014).

La rotura o erosión de la placa aterosclerótica es la causa más común de la trombosis que puede derivar en un evento cardiovascular agudo. El endotelio disfuncional de la placa de ateroma pierde sus propiedades homeostáticas normales, aumentando la expresión de moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas y disminuyendo la producción/disponibilidad de óxido nítrico. En estas circunstancias, las células endoteliales producen factor tisular (TF), una potente molécula procoagulante, y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), un inhibidor endógeno de la

fibrinólisis. Ambas moléculas promueven un estado protrombótico y desempeñan un papel crucial en las enfermedades vasculares (Agirbasli, 2005). Nuestro grupo ha demostrado que Fn14 colocaliza con PAI-1 y TF en placas ateroscleróticas humana (Muñoz-García et al., 2011). Además, la inyección sistémica de TWEAK aumenta la expresión de PAI-1 y TF en CMLV humanas en cultivo, y en las placas ateroscleróticas de ratones deficientes en *ApoE*. Por el contrario, el tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK, anti-Fn14 o un ARNsi de Fn14 disminuye la expresión de PAI-1 y TF en CMLV *in vitro*, por lo que el eje TWEAK/Fn14 estaría participando en esta respuesta protrombótica asociada a la rotura de la placa de ateroma (Muñoz-García et al., 2011).

## ***OBJETIVOS***

## Objetivos

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de morbimortalidad en los países desarrollados, por lo que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas es primordial. Sin embargo, el arsenal terapéutico disponible en la actualidad no nos permite modular con eficacia el remodelo patológico de la pared del vaso, evento clave en las complicaciones cardiovasculares. Nuestro grupo tiene una amplia experiencia investigando el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 durante el remodelado vascular que tiene lugar en enfermedades como la aterosclerosis y el aneurisma aórtico abdominal.

El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en los mecanismos de acción del sistema TWEAK/Fn14 sobre la célula de músculo liso vascular, así como el papel que desempeña CD163, un nuevo receptor de TWEAK, en el control de la activación de este sistema.

Los objetivos concretos fueron:

1. Identificar genes y vías reguladas por TWEAK en las CMLV mediante técnicas de secuenciación masiva del transcriptoma completo.
  - Una vez identificados los genes y rutas moduladas por TWEAK, profundizar en los mecanismos implicados en la proliferación y migración de las CMLV.
2. Estudiar el papel del eje TWEAK/Fn14 en un modelo de formación de neoíntima tras angioplastia.
  - Determinar el efecto de la delección génica de *Tnfrsf12a* o *Tnfrsf12*, así como la terapia basada en un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK frente a la hiperplasia de la neoíntima.
  - Comprobar la expresión de TWEAK y Fn14 en muestras humanas de arterias coronarias humanas con estenosis o reestenosis post-angioplastia.
3. Analizar el papel de CD163 en el desarrollo de la aterosclerosis.
  - Estudiar el papel de CD163 como receptor basurero en la aterosclerosis inducida por TWEAK, al igual que su capacidad para neutralizar las acciones proaterogénicas de TWEAK.
  - Evaluar la implicación de la expresión de CD163 en macrófagos y en la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK en CMLV.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## Materiales y Métodos

### 1. Modelos animales experimentales.

#### 1.1. Generación de ratones doble deficientes *ApoE*/*CD163*.

Ratones hembra *ApoE*<sup>-/-</sup> (#002052; Jackson Laboratory) se cruzaron con ratones macho *CD163*<sup>-/-</sup> (generosamente proporcionados por Søren K. Moestrup, Odense, Dinamarca), ambos en el fondo C57BL/6. La progenie resultante se cruzó con hembras *ApoE*<sup>-/-</sup> durante 5 generaciones, seguido de un entrecruzamiento para obtener el doble deficiente (*ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>) y sus ratones control de camada (*ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>). Todos los animales fueron genotipados mediante PCR usando muestras de ADN genómico obtenidas de cola mediante el kit REDExtract-N-Amp (Sigma-Aldrich). Para ello se utilizaron las siguientes sondas:

	Secuencia cebador directo (5' - 3')	Secuencia cebador inverso (5' - 3')
<b><i>CD163</i></b>	GTGTTCCAAAGTGGGAGGAG	TGGCTTGGTCTGTCTGTCCT
<b><i>ApoE</i></b>	TGTCTTCCACTATTGGCTCG	TGGCGGACCGCTATCAGGAC

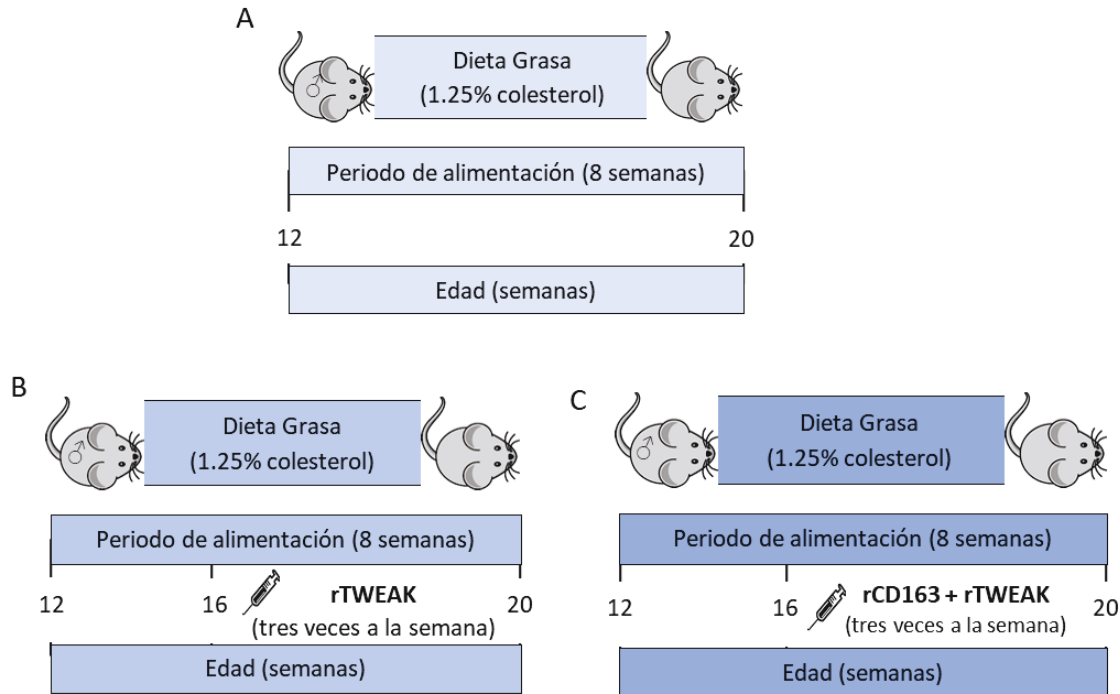
El alojamiento y cuidado de los animales y todos los procedimientos llevados a cabo en este estudio cumplieron estrictamente con la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el Comité de Bienestar Animal del IIS-Fundación Jiménez Díaz.

### 1.2. Procedimientos en animales.

#### 1.2.1. Modelos de aterosclerosis inducida por dieta grasa.

Para estudiar el efecto de la delección de *CD163* sobre las lesiones ateroscleróticas, ratones macho *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (N=10) y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (N=10) de 12 semanas de edad se alimentaron con una dieta rica en grasa (21.1 % grasa [0.15% colesterol] + 16.7% proteínas) durante 8 semanas (Fig. 8A). Por otra parte, para analizar el papel de *CD163* como receptor basurero de TWEAK, ratones macho *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (N=10) y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (N=10) de 12 semanas de edad alimentados con dieta grasa durante 8 semanas fueron inyectados con TWEAK murino recombinante (rTW; 5 µg/kg, tres veces por semana) durante las últimas 4 semanas (Fig. 8B). Un quinto grupo de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (N=8) alimentados con dieta grasa fueron inyectados con *CD163* murino recombinante (rCD163; 50 µg/kg, tres veces por semana) y dos horas después con TWEAK murino recombinante (rTW; 5 µg/kg, tres veces por semana) durante las últimas 4 semanas (Fig. 8C).

Todos los ratones se mantuvieron enjaulados con agua y dieta hipercolesterolémica disponibles *ad libitum*. Al final del estudio, los ratones en ayuno durante 16 horas se anestesiaron (100 mg/kg de ketamina y 15 mg/kg de xilacina), se perfundieron con solución salina y se sacrificaron. Se recogieron y almacenaron muestras de sangre e histológicas para su posterior estudio.

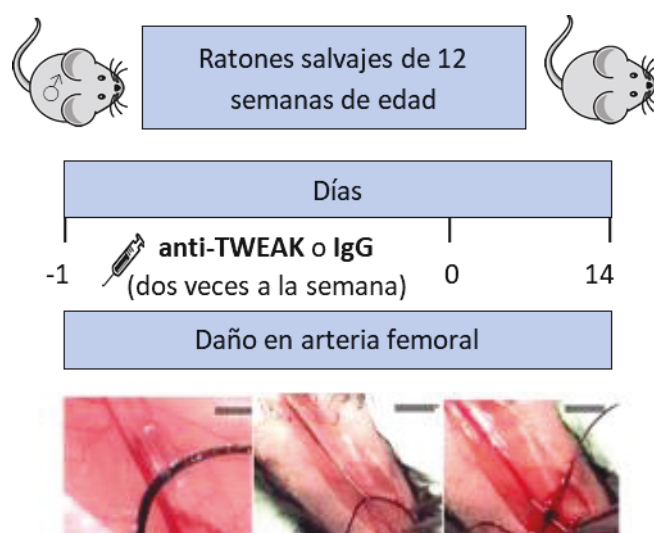


**Figura 8: Representación esquemática de los modelos de aterosclerosis inducidos por dieta grasa.**

### 1.2.2. Modelo de daño en arteria femoral.

Para el modelo de daño en arteria femoral se utilizaron ratones *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup>, *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup> (generosamente proporcionados por Biogen, Inc.), descritos previamente, así como sus controles de fenotipo salvaje. En este modelo se utilizaron ratones macho salvajes (N=9), deficientes en *Tnfrsf12a* (N=11) y deficientes en *Tnfrsf12* (N=10) de 10 semanas de edad. Para producir el daño en la arteria femoral se siguió el protocolo previamente descrito (Esteban et al., 2011; Roque et al., 2000). Los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina durante la operación y la lesión endoluminal de la arteria femoral se realizó mediante la introducción de una guía de angioplastia de 0,25 mm de diámetro (ev3™, Medtronic). Para ello se realizó una pequeña incisión en la pata trasera del ratón para exponer la arteria femoral y aislarla de los vasos y nervios adyacentes sin dañar ninguna estructura. Una vez aislada la arteria, se produjo el clampaje de la arteria a nivel del ligamento inguinal para evitar el paso de flujo sanguíneo. Posteriormente, se realizó una incisión en la arteria para la introducción de la guía de angioplastia tres veces consecutivas. Tras sacar la guía de angioplastia, se cerró la incisión con una seda y se selló la herida. Este protocolo se realizó en ambas patas traseras de los animales. En los ratones controles (no dañados), se realizó la incisión y el clampaje sin causar daño con la guía de angioplastia.

Para estudiar el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK, los ratones de tipo salvaje de 12 semanas de edad se dividieron en dos grupos: ratones inyectados intraperitonealmente con el mAb anti-TWEAK (10 mg/kg, dos veces por semana) o con un IgG control de isotipo irrelevante (10 mg/kg dos veces por semana) durante 14 días (Fig. 9). Biogen, Inc. proporcionó generosamente tanto el mAb anti-TWEAK (clon P2D10; mIgG2a generado al inmunizar ratones deficientes en TWEAK en el fondo C57BL/6 con TWEAK humano recombinante) como el IgG control (Hen egg lysozyme). Al final del estudio, los ratones se anestesiaron, se perfundieron con solución salina y se sacrificaron. Se recogieron muestras de sangre e histológicas para su posterior estudio.



**Figura 9: Representación del modelo de daño en arteria femoral.** Se indica el tratamiento realizado con anti-TWEAK o IgG a ratones salvajes durante 14 días, empezando el día de antes de realizar el daño en la arteria femoral.

### 1.3. Procesamiento de los tejidos.

Se recogieron las muestras histológicas para la realización de los diferentes análisis morfométricos. En el caso del modelo de aterosclerosis inducida por dieta grasa se aislaron muestras de raíz aórtica y de la arteria braquiocefálica. Tanto las arterias braquiocefálicas como los senos aórticos fueron cuidadosamente congelados en OCT (Tissue-Tek). La aorta completa se aisló eliminando el tejido graso adherido y se congeló en nitrógeno líquido, para estudios de expresión génica.

En el modelo de daño en arteria femoral, se extirpó la arteria femoral desde el ligamento inguinal hasta la ramificación de la arteria femoral profunda, una parte se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas, posteriormente se deshidrataron y se incluyó en parafina para histología y la otra se congeló y guardó en nitrógeno líquido para estudios de expresión génica.

#### 1.4. Procesamiento de las sangres.

Se recogieron muestras de sangre para análisis bioquímicos. Las concentraciones de colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos del plasma de los animales del modelo de aterosclerosis inducida por dieta grasa se midió por métodos automatizados en nuestro laboratorio central (IIS-Fundación Jiménez Díaz). La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) sérica se midió con el kit de ensayo colorimétrico de LDH (ab102526; Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2. Procesamiento de muestras humanas.

Las arterias coronarias con stent y sin stent se aislaron de los corazones de pacientes sometidos a trasplante cardíaco. Las arterias coronarias se clasificaron según su localización, estado ateromatoso, naturaleza del donante, y se almacenaron en el biobanco del INSERM U1148 en el Hospital Bichat (París, Francia). La Junta de Revisión Institucional, IRB 0006477 de Hôpitaux Universitaires Paris-Nord Val de Seine, Paris7 University, y Assistance Publique-Hôpitaux de Paris aprobó el uso de corazones explantados para la investigación. Las arterias coronarias sanas humanas se obtuvieron de corazones recién extraídos durante las operaciones de trasplante cardíaco en el Hospital de la Santa Creu I Sant Pau (Barcelona, España). El comité de ética local aprobó el uso de arterias coronarias sanas. Las arterias coronarias se utilizaron para estudios inmunohistoquímicos.

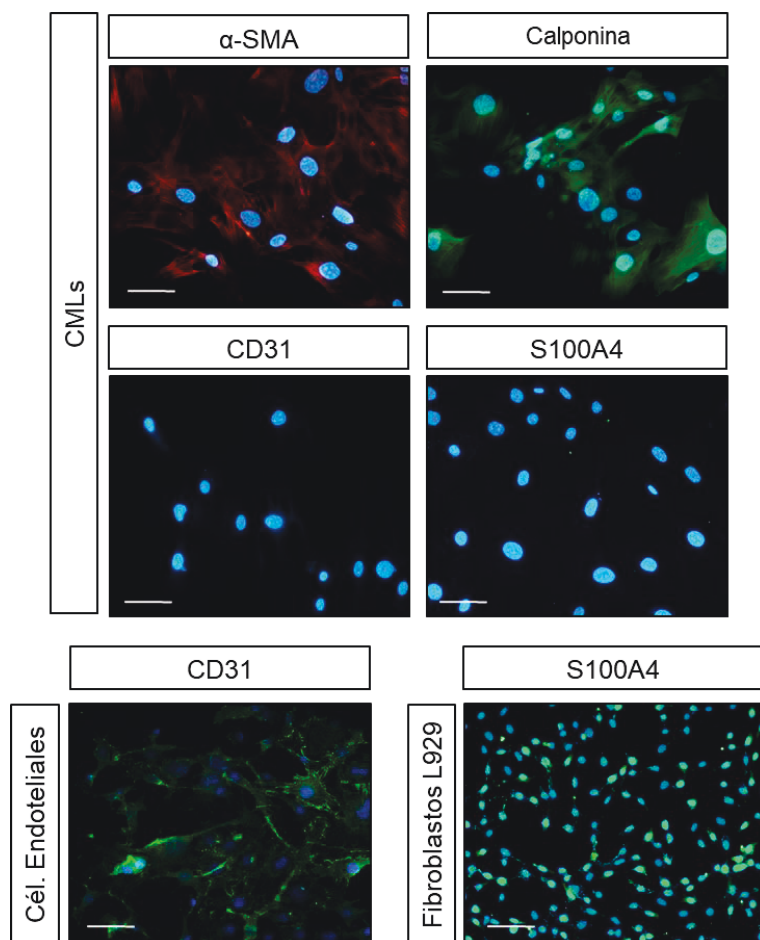
#### 3. Cultivos celulares.

##### 3.1. Células de músculo liso vascular de ratón.

Las CMLV se obtuvieron a partir de aortas de ratones C57BL/6 de fenotipo salvaje o de ratones *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> de 12-16 semanas de edad. Tras el sacrificio de los ratones previamente anestesiados, se extrajeron las aortas abdominales y torácicas y se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido. Los vasos se diseccionaron en pequeños anillos que se incubaron con 1 mg/mL de collagenasa tipo II (290 U/mg; Sigma) resuspendida en medio DMEM (Sigma) suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y glutamina (2 mmol/L) (Sigma) durante 30 minutos a 37°C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. La reacción de la collagenasa se detuvo con DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS) y tras varios lavados, los explantes se sembraron con DMEM suplementado con 20% de FBS. Las células se cultivaron y se pasaron cada 2-3 días según la confluencia. Para los experimentos, las células se usaron entre los pases 3 al 7. Antes de los experimentos de estimulación, las células fueron privadas de suero mediante la incubación en medio DMEM sin FBS o con 0.5% FBS durante 24 horas. Las CMLV se trataron con los compuestos y las concentraciones indicadas en la tabla 1.

Para garantizar la pureza de los métodos de aislamiento de los cultivos primarios de CMLV, las células fueron teñidas con marcadores específicos de CMLV como  $\alpha$ -SMA (A2547; Sigma) y calponina

(ab46794; Abcam), de células endoteliales (CD31, ab28364; Abcam) y de fibroblastos (S100A4, ab93283; Abcam) (Fig. 10).



**Figura 10: Comprobación de la pureza de las CMLVs de los cultivos primarios.** Fotografías representativas de CMLVs ( $\alpha$ -SMA y calponina), fibroblastos (S100A4) y el marcador de células endoteliales (CD31) en CMLV aislada de las aortas de ratones. Se utilizaron células endoteliales murinas y fibroblastos L929 como controles positivos para CD31 y S100A4 respectivamente. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

### 3.2. Macrófagos peritoneales de ratón.

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones deficientes en *ApoE* o doble deficientes en *ApoE/CD163* de 12-16 semanas de edad a los que se les inyectó tioglicolato al 3% (wt/vol) de manera intraperitoneal 72 horas antes de la extracción. Pasado ese tiempo, los ratones fueron anestesiados y se extrajeron los macrófagos peritoneales mediante lavados de la cavidad peritoneal con solución salina. Las células se cultivaron en RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de FBS, L-glutamina, y antibióticos durante 24 horas a 37°C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez asentadas, las células fueron estimuladas durante 48 horas en medio que contenía 2% de FBS y 4 U/ml de IL-10 (11340103; Immunotools). Los macrófagos fueron tratados con los compuestos que se indican en la tabla 1.

Compuesto	Concentración	Casa Comercial	Experimento
<b>TWEAK murino recombinante (rTW)</b> (1237-TW)	0,1 µg/mL	R&D Systems	Estimulación de CMLV.
<b>CD163 murino recombinante (rCD163)</b> (7435- CD)	0,01 µg/mL 0,05 µg/mL 0,1 µg/mL 0,5 µg/mL	R&D Systems	Estimulación de CMLV.
<b>TWEAK humano recombinante (rTWEAK)</b> (GF348)	0,05 µg /mL 0,1 µg /mL	Milipore	- Estimulación de CMLV. - Ensayo de cierre de herida (CMLV). - Ensayo de ciclo celular (CMLV). - Ensayo de proliferación (CMLV). - Ensayo de transfección (CMLV).
<b>Actinomicina D (ActD)</b> (A9415)	0,01 µg/mL	Sigma	Inhibición de proliferación en ensayos de cierre de herida (CMLV).
<b>IL-10</b> (11340103)	4 U/mL	Inmunotools	Estimulación de macrófagos peritoneales.
<b>Dil-LDL oxidadas</b> (L34358)	10 µg/mL	ThermoFisher Scientific	- Ensayos de formación de células espumosas (macrófagos peritoneales) - Ensayos de absorción (macrófagos peritoneales)
<b>Anti-CD36</b> (ab23680)	2 µg/mL	Abcam	- Inhibición del receptor CD36 en ensayos de formación de células espumosas (macrófagos peritoneales). - Marcaje de macrófagos peritoneales para ensayos de citometría de flujo.

**Tabla 1:** Compuestos utilizados *in vitro*.

## 4. Ensayos de migración.

### 4.1. Ensayos de transwell.

La capacidad migratoria se evaluó mediante ensayos de transwell. Por un lado, se utilizó la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7 (TIB-71; American Type Culture Collection) que se mantuvo en cultivo con medio RPMI suplementado con 10% FBS, L-glutamina y antibióticos. Para los ensayos, las células se resuspendieron en 0.2% de BSA en DMEM y se sembraron  $70 \times 10^4$  células por pocillo en la parte superior de las cámaras quimiotácticas de migración con un tamaño de poro de 8 µm (Costar). En la parte inferior de los pocillos se añadieron los sobrenadantes de las CMLV con las diferentes

condiciones experimentales: control, 0,1 µg/mL rTW, rTW + 0,1 µg/mL rCD163, rTW + 0,5 µg/mL rCD163. Después de 4 horas de incubación, los núcleos de las células migradas se fijaron con 4% PFA y se tiñeron con DAPI. El número de células migradas se contó en 10 campos seleccionados al azar con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400.

Por otro lado, las CMLVs procedentes de ratones salvajes o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> se sembraron en cámaras quimiotácticas con membranas de 8 µm de poro (Costar). Las células se resuspendieron en DMEM con 0.2% BSA a una confluencia de 70x10<sup>4</sup> células por pocillo en la cámara de migración. Como estímulo quimiotáctico se utilizó medio de cultivo DMEM suplementado con 0.5% FBS y 50 ng/ml o 100 ng/ml de rTWEAK. Se usó FBS al 10% como control positivo de la capacidad migratoria. Después de 4 horas, las células no migradas se eliminaron de la parte superior de la cámara y los núcleos de las células migradas se fijaron y se tiñeron con DAPI. La cuantificación de las células migradas se realizó en 10 campos seleccionados al azar mediante el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400.

#### 4.2. Ensayos de cierre de herida.

La capacidad migratoria se evaluó mediante experimentos de cierre de heridas. Se sembraron CMLVs procedentes de ratones de tipo salvaje o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> en placas de 12 pocillos con medio de cultivo DMEM al 20% FBS hasta alcanzar la máxima confluencia. 24 horas antes de la estimulación se les cambio a medio con 0.5% FBS. Se realizó una herida por medio de raspado con la punta de una pipeta de plástico sobre la monocapa de células. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron en presencia o ausencia de rTWEAK (100 ng/ml). Se usó 10% FBS como control positivo. Para inhibir la proliferación de las CMLVs, las células se preincubaron 30 minutos con una dosis antiproliferativa de actinomicina D (0,01 µg/ml; A9415 Sigma) antes de la estimulación con rTWEAK. Para determinar la velocidad de cierre de las hendiduras, se monitorizó mediante fotomicroscopía la migración de las células hacia la zona de la herida. Se captaron cuatro imágenes de cada pocillo a diferentes tiempos de estimulación (0, 18, 30 horas), se cuantificó el área libre de células usando el software ImageJ y se normalizaron respecto al tiempo inicial.

#### 5. Ensayos de formación de células espumosas.

Se sembraron macrófagos peritoneales de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> sobre cámaras de portaobjetos de 8 pocillos (Lab-Tek; Thermo Scientific). Una vez asentadas, las células se estimularon durante 48 horas en medio de cultivo que contenía 2% de FBS y 4 U/ml de IL-10. A continuación, se incubaron con 10 µg/ml de Dil-LDLox (L34358; ThermoFisher Scientific) durante diferentes tiempos (2, 4 y 6 horas). En algunos casos, se inhibió el receptor CD36 en los macrófagos peritoneales mediante estimulación con 2 µg/mL de anti-CD36 (Ab23680; Abcam) una hora antes de la adicción de 10 µg/ml de Dil-LDLox. Las células se fijaron en PFA al 4% durante 15 minutos y se tiñeron con DAPI. El porcentaje



de células espumosas se analizó en 5-10 campos diferentes al azar por cultivo celular usando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400.

## 6. Citometría de flujo.

### 6.1. Ensayos de ingestión de dil-LDL oxidadas en macrófagos.

Se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> y se incubaron en medio con IL-10 (4 U/ml) durante 48 horas. Posteriormente, se cambió el medio de cultivo y se añadieron 10 µg/ml Dil-LDLox durante 2 horas a 37°C. Para la citometría de flujo, las células se lavaron y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS para su posterior análisis con un citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Biosciences).

### 6.2. Marcaje de macrófagos.

Para la inmunotinción de CD36, se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> que se incubaron en medio con IL-10 (4 U/ml) durante 48 horas. Después de centrifugarlas, las células se resuspendieron en PBS que contenía BSA al 4% y se incubaron con solución de bloqueo BD Fc de ratón (553141; BD Pharmingen) durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron durante 18 horas a 4°C con anti-CD36 (Ab23680; Abcam). Como anticuerpo secundario se usó el anticuerpo secundario de cabra conjugado con Alexa Fluor 488 (A11001; Life Technology). Las células se contaron por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Biosciences).

### 6.3. Ensayos de ciclo celular.

Las CMLVs de ratones salvajes o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> se sembraron en presencia de 10% FBS. Al 80% de confluencia, las células se lavaron y se mantuvieron en medio al 0% FBS durante 24 horas. Tras el periodo de depleción, las células se estimularon con o sin rTWEAK (50-100 ng/ml) durante 18 horas. Se usó FBS al 10% como control positivo. Tras el periodo de incubación, las células se tripsinizaron y se fijaron con etanol al 70% durante toda la noche, se lavaron e incubaron en PBS 1X que contenía 100 µg/ml de ARNasa A, 10 µg/ml de yoduro de propidio (PI) y 0.05 Nonidet P-40%. El número total de células y el porcentaje de células en las fases G0-G1, S o G2-M se contabilizaron utilizando métodos de citometría de flujo estándar y un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

### 6.4. Ensayos de proliferación.

Las CMLVs de ratones salvajes o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> se sembraron en medio con 10% FBS y se deplecionaron 24 horas antes del experimento para detener la proliferación. Se estimularon con o sin rTWEAK 100 ng/ml a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas). Se usó FBS al 10% como control positivo. Las células se contaron utilizando métodos de citometría de flujo estándar y un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

## 7. Ensayos de acumulación y salida de colesterol.

Los macrófagos peritoneales de ratones *ApoE<sup>-/-</sup>* o *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* se sembraron en placas de 6 pocillos ( $2 \times 10^6$  células/pocillo) y una vez asentados se incubaron con IL-10 (4 U/ml) durante 48 horas. A continuación, se marcaron con colesterol [ $1\alpha$ ,  $2\alpha$  ( $n$ ) - $^3$ H] (1  $\mu$ Ci por pocillo) durante 48 horas en medio RPMI 5% FBS y 50  $\mu$ g/mL de LDL acetilada. Las células se lavaron y se incubaron con medio sin suero, que fue complementado con 0.2% BSA sin ácidos grasos durante 18 horas para permitir el equilibrio del colesterol radiomarcado con el colesterol intracelular. Este paso experimental se llevó a cabo en condiciones basales y después se añadió el agonista del receptor de hígado X (LXR) T0901317 (4  $\mu$ M) para inducir la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1. Las células marcadas con colesterol tritiado [ $^3$ H] se incubaron durante 4 horas a 37°C con suero murino deplecionado de apolipoproteína B (apoB) con ácido fosfotungstico 0,48 mM y MgCl<sub>2</sub> 22mM a una concentración equivalente al 5% de suero diluido en RPMI. El colesterol [ $^3$ H] expulsado al medio mediado por los aceptores de colesterol (HDL) y el que permaneció en el interior de las células fue medido en un contador de centelleo tras añadir a los medios o extractos celulares 4 ml de líquido de centelleo. Los macrófagos se extrajeron con NaOH 0,5M. Se calculó el porcentaje de flujo de salida de colesterol mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ salida colesterol} = \left[ \frac{\text{cpm en el medio}}{(\text{cpm en el medio} + \text{cmp en los macrófagos})} \right] \times 100$$

## 8. Transfección con ARN pequeño de interferencia.

Las CMLV provenientes de ratones salvajes fueron transfectadas al alcanzar una confluencia del 50-60% con 25 nmol/L de un ARN pequeño de interferencia (ARNsi) frente a Fn14 o un control negativo (scramble ARNsi; Ambion) usando el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies). Las células transfectadas fueron deplecionadas durante 24 horas antes del tratamiento de 18 horas con o sin rTWEAK (100 ng/ml).

## 9. Análisis de proteínas.

### 9.1. Extracción de proteínas totales.

Las CMLV de ratones salvajes o *Tnfrsf12a<sup>-/-</sup>* cultivadas en diferentes condiciones experimentales se recogieron y se lisaron en tampón de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, Tritón X-100 al 0,2%, NP-40 al 0,3%, 0,2 mM PMSF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.2 mM y 10  $\mu$ L/mL de cóctel inhibidor de fosfatasa (P0044 Sigma). La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de BCA (Thermo Scientific).

## 9.2. Western blot.

Después de normalizar para una concentración de proteína igual (20 µg), los lisados celulares se mezclaron con tampón de carga y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las muestras se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno; Millipore) previamente activadas con metanol. Al finalizar la transferencia, las membranas se tiñeron con solución Ponceau (Sigma) para la rápida visualización de las bandas de proteínas. Tras varios lavados, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBS-Tween20 (1 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl y 0,1% Tween-20) con 5% de leche desnatada en polvo para evitar uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios descritos en la tabla 2. Tras sucesivos lavados en TBS-T, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP (Jackson Laboratory) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de anticuerpos mediante sucesivos lavados, las bandas se detectaron por quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences) y se visualizaron con el software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-sciences). Se cuantificaron los geles con el software ImageJ del NIH (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) usando  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

<i>Anticuerpo primario</i>			<i>Anticuerpo secundario</i>	
<b>Antígeno</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>	<b>Antígeno (huésped)</b>	<b>Dilución</b>
<b>anti- NF-<math>\kappa</math>B p65</b>	Cell Signaling (D14E12)	1/1000	Policlonal conejo	1/5000
<b>anti- fosfo-NF-<math>\kappa</math>B p65</b>	Cell Signaling (S536)	1/1000	Policlonal conejo	1/5000
<b>anti- ERK 1/2</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-514302)	1/1000	Monoclonal ratón	1/5000
<b>anti- fosfo- ERK 1/2</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7383)	1/1000	Monoclonal ratón	1/5000
<b>anti- AKT</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-81434)	1/1000	Monoclonal ratón	1/5000
<b>anti- fosfo- AKT</b>	Cell Signalling (S473)	1/1000	Policlonal conejo	1/5000
<b>anti-Fn14</b>	Abcam (EPR3179)	1/1000	Policlonal conejo	1/5000
<b>anti-P15<sup>INK4B</sup></b>	Sigma (AV03047)	1/500	Policlonal conejo	1/5000
<b>anti-CDK4</b>	Abcam (ab137675)	1/1000	Policlonal conejo	1/5000

<b>anti-CDK6</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc53638)	1/1000	Monoclonal ratón	1/5000
<b>anti-Ciclina D1</b>	Santa Cruz Biotechnology (s18396)	1/1000	Monoclonal ratón	1/5000
<b>anti-<math>\alpha</math>-tubulina</b>	Sigma (T5168)	1/10000	Monoclonal ratón	1/5000

**Tabla 2. Condiciones utilizadas para Western blot.** Anticuerpos secundarios suministrados por Jackson Laboratory.

En algunas ocasiones y para incubar una misma membrana con sucesivos anticuerpos primarios, se eliminaron los anticuerpos previamente unidos sumergiendo la membrana en tampón de “stripping” (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) durante 30 minutos a 50°C y lavando al menos tres veces con TBS-Tween20 antes de empezar una nueva inmunodetección.

## 10. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Los sobrenadantes de las CMLV estimuladas con rTW (0,1  $\mu$ g/mL) o rTW y rCD163 (0.01-0.5  $\mu$ g/mL) durante 24 horas se utilizaron para hacer ensayos de ELISA para determinar la concentración de CCL2 y CCL5 (MJE00 y MMR00; R&D Systems, respetivamente). Tomamos 100  $\mu$ l de cada punto del experimento y realizamos el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA, expresando los valores en pg/mL.

## 11. Análisis de RNA.

### 11.1. Extracción de RNA.

El RNA total procedente de células y tejidos murinos se extrajo por el método del Trizol (Invitrogen, Life Technologies). En el caso de los extractos celulares, las CMLVs y macrófagos peritoneales se lavaron con PBS, se levantaron de la placa con ayuda de un rascador y se pasaron a tubos para empezar la extracción con trizol. Las muestras de tejido aórtico y femoral murino se congelaron en nitrógeno líquido, se homogenizaron de forma mecánica mediante mortero y el pulverizado se resuspendió en trizol. La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), y se comprobó que las muestras tuvieran una relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm cercano a 2, indicando una ausencia de contaminación por proteínas.

### 11.2. PCR.

Para obtener ADNc realizamos una reacción de transcripción inversa a partir de 2 µg de RNA usando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

### 11.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

La PCR a tiempo real se realizó a partir de 50 ng de ADNc utilizando el sistema de análisis de expresión génica Taqman o SYBER green dependiendo de los genes a analizar y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Por un lado, se utilizó el sistema de detección secuencial TaqMan ABI 7700 utilizando la polimerasa TaqDNA activada por calor (Amplitaq Gold) y cebadores comerciales (base de datos de Applied Biosystems). Después de un paso inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las sondas utilizadas fueron suministradas por Applied Biosystems y se encuentran indicadas en la tabla 3. Se utilizó 18S rRNA como gen normalizador y se amplificó en paralelo con los genes de interés.

En otros casos, se utilizaron sondas no comerciales (diseñadas con el software Primer-BLAST (NCBI-NIH) y sintetizadas por Fisher Scientific) y la polimerasa suministrada en la mezcla SYBR Premix Ex TaqTM (Takara Biotechnology). En este caso se realizó un programa de tres pasos; con un paso inicial de 2 minutos a 50°C, después las muestras se sometieron a 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C durante 40 ciclos, y para finalizar un paso de disociación de 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 15 segundos a 98°C. Las secuencias del cebador de los distintos genes analizados se resumen en la tabla 3. Los niveles de ARNm de los genes de ratón analizados se normalizaron al contenido de ARNm de GADPH.

Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se analizaron usando el programa informático 7500 System SDS Software V1.2b1c3 (Applied Biosystems). La cantidad de ARNm en las muestras se estimó mediante el método de cuantificación relativa  $2\Delta CT$ . Los valores de cada muestra se obtuvieron como múltiplos de sus valores de referencia.

Gen	Referencia sonda Taqman
<b><i>CCL5</i><sup>1</sup></b>	Mm01302428_m1
<b><i>CCL2</i><sup>1</sup></b>	Mm00441242_m1
<b><i>MMP-2</i><sup>1</sup></b>	Mm00439498
<b><i>MMP-9</i><sup>1</sup></b>	Mm00442991
<b><i>ICAM1</i><sup>1</sup></b>	Mm00516023_m1
<b><i>Tnfrsf12a</i><sup>1</sup></b>	Mm_00489103_m1
<b><i>Tnfrsf12</i><sup>1</sup></b>	Mm 02583406_s1

<b>CD163<sup>1</sup></b>	Mm00474091_m1
<b>18S<sup>2</sup></b>	4310893E

Gen	Secuencia cebador directo (5'-3')	Secuencia cebador inverso (5'-3')
<b>Nos2<sup>3</sup></b>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
<b>Arg1<sup>3</sup></b>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
<b>SR-A<sup>3</sup></b>	TGAACGAGAGGATGCTGACTG	GGAGGGGCCATTTTATGTC
<b>CD36<sup>3</sup></b>	GAACCACTGCTTTCAAAAAGTGG	TGCTGTTCTTTGCCACGTCA
<b>ABCG1<sup>3</sup></b>	TTCATCGTCCTGGGCATCTT	CGGATTTTGTATCTGAGGACGAA
<b>ABCA1<sup>3</sup></b>	AGTGATAATCAAAGTCAAAGGCACAC	AGCAACTTGGCACTAGTAACCTCTG
<b>GADPH<sup>3</sup></b>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<b>CcnB1<sup>3</sup></b>	AAGGTGCCTGTGTGTGAACC	GTCAGCCCCATCATCTGCG
<b>CcnB2<sup>3</sup></b>	GCCAAGAGCCATGTGACTATC	CAGAGCTGGTACTTTGGTGTTT
<b>CcnD1<sup>3</sup></b>	GCGTACCCTGACACCAATCTC	CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC
<b>CcnE1<sup>3</sup></b>	GTGGCTCCGACCTTTTCAAGTC	CACAGTCTTGCAATCTTGGCA
<b>CcnE2<sup>3</sup></b>	ATGTCAAGACGCAGCCGTTTA	GCTGATTCTCCAGACAGTACA
<b>CcnF<sup>3</sup></b>	GTAGGTGTGCCAAGTGTTTCT	TTCTGGGAGACTCAAGATGGTT
<b>Cdk1<sup>3</sup></b>	AGAAGGTACTTACGGTGTGGT	GAGAGATTTCCGAATTGCAGT
<b>Cdk4<sup>3</sup></b>	ATGGCTGCCACTCGATATGAA	TCCTCCATTAGGAAGTCTCACAC
<b>Cdk6<sup>3</sup></b>	TCTCACAGAGTAGTGCATCGT	CGAGGTAAGGGCCATCTGAAAA
<b>Cdkn2B<sup>3</sup></b>	CCCTGCCACCTTACCAGA	CAGATACCTCGCAATGTCACG

**Tabla 3. Cebadores murinos empleados en la PCR a tiempo real.** Marcaje: Taqman (<sup>1</sup>FAM o <sup>2</sup>VIC) y <sup>3</sup>Sybr Green.

## 12. Análisis histológico.

### 12.1. Procesamiento y análisis morfométrico del seno aórtico, la arteria braquiocefálica y la arteria femoral.

#### Seno aórtico

Las raíces aórticas se seccionaron a 5 µm de grosor en el criostato comenzando por la sección del corazón más alejada al sitio de unión de la aorta y se recogió en la primera evidencia de las válvulas aórticas. Las secciones se tiñeron con Oil-red-O (Sima-Aldrich) y hematoxilina (Dako) a intervalos de 100 µm desde el punto 0 hasta el final de las válvulas aórticas.

El área de la lesión máxima se calculó para cada ratón haciendo un promedio de los valores en tres secciones con máxima lesión. Las áreas de lesiones máximas individuales se promediaron adicionalmente para determinar el área de lesión máxima para cada grupo. La tinción de rojo de Picrosirius (Sigma-Aldrich) se realizó para el análisis del contenido de colágeno midiendo la birrefringencia a la luz polarizada en el plano.

Para analizar el efecto de la deficiencia de CD163 en la progresión de las placas ateroscleróticas en ratones, utilizamos el método de Sary (Sary et al., 1994), que clasificó las lesiones ateroscleróticas

en función de su composición y estructura histológicas: grado I, placas tempranas que contienen solo macrófagos; grado II, lesiones que contienen macrófagos, CMLV y algunos cristales de colesterol; grado III, lesiones que contienen macrófagos, CMLV y numerosos cristales de colesterol; y grado IV, placas avanzadas que contienen macrófagos, CMLV y un núcleo lipídico.

### Arteria braquiocefálica

Las arterias braquiocefálicas se seccionaron en serie a 5 µm de grosor desde la raíz aórtica hasta la arteria subclavia derecha. Para el análisis morfométrico, se tiñeron secciones de cada arteria braquiocefálica con pentacrómico de Movat (Electron Microscopy Science) a intervalos de 90 µm de 0 a 450 µm distales a la raíz aórtica. Se evaluó la frecuencia de las características de inestabilidad de la placa en cada sección teñida con Movat (5 portaobjetos por animal, 40 portaobjetos por grupo), incluidos los siguientes: núcleo necrótico grande (definido como > 50% del volumen de la placa), cápsula fibrosa delgada (definida como <3 capas de células), erosión medial (definida como presencia en la capa media de componentes de la placa) y la presencia de cápsulas enterradas (firma de rotura silenciosa de la placa y confirmada por tinción de α-SMA). La frecuencia de la lesión para cada animal se determinó con un máximo posible del 100%.

### Arteria femoral

Las arterias femorales se cortaron en secciones en serie de 5 µm. Las secciones transversales tomadas a intervalos regulares en toda la arteria se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para los análisis morfométricos, se usó microscopía Leica DMD 108 para medir la lámina elástica externa, la lámina elástica interna y la circunferencia de la luz para calcular el área de la media y neoíntima y la relación neoíntima/media 14 días después de la dilatación.

## 12.2. Tinciones de tejidos con colorantes.

### 12.2.1. Hematoxilina & Eosina.

Las secciones de parafina se desparafinaron, rehidrataron, y se tiñeron con Hematoxilina 7211 (Richard-Allan Scientific) durante 1-5 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se incubaron con 5% de Eosina (Shandon) durante 1-3 minutos. Las secciones se volvieron a deshidratar y se montaron con DPX. En el caso de las secciones de OCT, estas se fijaron con acetona fría durante 10 minutos, se lavaron en H<sub>2</sub>O durante 5 minutos, se contratiñeron con Hematoxilina durante 1-2 minutos, y posteriormente con 5% Eosina durante 1 minuto. Estas secciones se montaron en gelatina glicerilada Kaiser (Merk).

### 12.2.2. Oil Red O.

El contenido de lípidos en las placas de ateroma se evaluó mediante tinción de Oil Red O. Las secciones tisulares en OCT se fijaron con acetona fría durante 10 minutos, se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos, en isopropanol al 60% cuatro veces y se tiñeron durante 30 minutos en una solución de 0.5% Oil Red O (Sima O0625) en isopropanol. Tras lavarlas de nuevo con isopropanol, se contratiñeron con hematoxilina, se lavaron en agua y se montaron en medio acuoso de gelatina glicerilada Kaiser.

### 12.2.3. Rojo picosirius.

El contenido de colágeno en las placas de ateroma se evaluó mediante tinción de rojo sirio con ácido pícrico (rojo picosirio), un colorante para fibras conectivas compuestas principalmente por colágeno. Los cortes tisulares en OCT fueron fijados con PFA 4%, se sumergieron en etanol 100% y se tiñeron durante 2 horas con solución de rojo picosirio (Sigma-Aldrich). Después de tres lavados con etanol 100%, se deshidrataron con xilol durante 5 minutos y se montaron con DPX (British Drug House). Las tinciones se evaluaron en un microscopio con luz polarizada (DMD108; Leica Microsystems).

### 12.2.4. Pentacrómico de Movat.

Se utilizó la tinción de pentacrómico de Movat para resaltar los componentes del tejido conectivo (colágeno, elastina, músculo, mucina y fibrina). Se utilizaron cinco colorantes y distintas soluciones siguiendo las instrucciones del kit (Electron Microscopy Science): Solución Bovin (50°C durante 10 minutos), Azul Alcían (25 minutos, tinción azul de mucopolisacáridos), Alcohol Alkaline (56°C durante 10 minutos), Solución de orceína (4-5 minutos), escarlata de Biebrich combinada con fucsina ácida (1 hora y 30 minutos, tinción roja de músculo y fibrina), ácido acético (30 segundos), ácido phosphotungstic, tres lavados de etanol 100%, solución alcohólica de azafrán (8 minutos, tinción amarilla de fibras de colágeno y reticulares), se deshidrataron las muestras con xilol y se montaron con DPX.

## 12.3. Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencias.

Las muestras incluidas en parafina procedentes de coronarias humanas y del modelo experimental de daño femoral fueron desparafinadas y rehidratadas. En el caso de las muestras incluidas en OCT de los modelos de aterosclerosis se fijaron en acetona fría (4°C) durante 10 minutos. Para desenmascarar los epítomos en las muestras de parafina las secciones se incubaron en buffer de citrato (10nM, pH 6.0) a 95°C durante 20 minutos (PTlink). La actividad de la peroxidasa endógena se inactivó con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:metanol (1:1) durante 30 minutos. A continuación, se eliminaron las uniones inespecíficas con la solución de bloqueo (PBS con 4% BSA y suero de la especie del anticuerpo secundario) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche (Tabla 4). Tras lavar con PBS, las secciones se incubaron durante



1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina y diluidos en PBS con 4% BSA. Después se trataron con el complejo avidina-biotina (ABComplex; Dako) durante 30 minutos. La detección de anticuerpo se determinó mediante la adición del sustrato-cromógeno diaminobenzidina (DAB; Dako) o aminoetilcarbazol (AEC+; Dako) durante 3-5 minutos. Por último, las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos. Los cortes de parafina se deshidrataron y montaron con DPX (British Drug House), mientras que los de OCT se montaron con medio acuoso con gelatina glicerilada Kaiser (Merk).

Los anticuerpos primarios utilizados para los tejidos de ratón y humano, así como su concentración, viene especificada en la tabla 4. La especificidad de los anticuerpos se comprobó mediante controles negativos en los que se sustituyó el anticuerpo primario por su correspondiente IgG control inespecífica. Como anticuerpos secundarios se usaron la biotina de oveja anti-ratón, la biotina de burro anti-conejo y la biotina de cabra anti-rata (Amersham).

En el caso de las inmunofluorescencias (IF) para los estudios de colocación, los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron Alexa Fluor 488 anti-conejo (excitación a 488 nm, emisión a 519-643 nm) y Alexa Fluor 568 anti-rata (excitación a 568, emisión a 573-792). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (excitación a 405 nm, emisión a 420-475 nm). Las muestras de IF fueron montadas con medio de montaje Fluorsave (Merk). La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio invertido de luz visible y fluorescencia (Nikon Eclipse 4000) con los programas de análisis de imágenes ACT-1 (Nikon).

Anticuerpo primario	Casa comercial	Especie	IHQ	IF	Secundarios
<b>anti-CD68</b>	Abcam (ab53444)	Rata	1/200 Femoral	1/200 Placa ateroma	<u>IHQ</u> : anti-IgG rata 1/200 <u>IF</u> : anti-IgG rata AlexaFluor568 1/500
<b>Anti-<math>\alpha</math>-actina FITC (Clon 1A4)</b>	Sigma (F3777)	Ratón		1/1000 Placa ateroma, CMLV, Femoral	-----
<b>Anti-calponina</b>	Abcam (ab46794)	Conejo	1/100 Femoral	1/200 CMLV	<u>IHQ</u> : Anti-IgG conejo 1/500 <u>IF</u> : Anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-TWEAK</b>	Novus (NBP1-67774)	Conejo	1/50 Femoral		Anti-IgG conejo 1/200

<b>anti-Fn14</b>	Cell Signaling (4403S)	Conejo	1/50 Femoral	1/50 CMLV	<u>IHQ</u> : Anti-IgG conejo 1/200 <u>IF</u> : Anti-IgG conejo 1/200
<b>anti-cyclin D1</b>	Cell Signalling (92G2)	Conejo	1/50 Femoral		Anti-IgG conejo 1/200
<b>anti-CDK4</b>	Abcam (ab137675)	Conejo	1/100 Femoral		Anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-CDK6</b>	GeneTex (GTX103992)	Conejo	1/100 Femoral		Anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-p15<sup>INK4B</sup></b>	Sigma (AV03047)	Conejo	1/100 Femoral		Anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-PCNA</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7907)	Conejo	1/200 Femoral	1/200 Femoral	<u>IHQ</u> : anti-IgG conejo 1/500 <u>IF</u> : anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-CD3</b>	Dako (A0452)	Conejo/ Humano	1/500 Femoral		anti-IgG conejo 1/200
<b>anti-CD31</b>	Abcam (ab28364)	Conejo	1/50 Femoral	1/50 CMLV	<u>IHQ</u> : anti-IgG conejo 1/200 <u>IF</u> : anti-IgG conejo 1/200
<b>anti-S100A4</b>	Abcam (ab93283)	Ratón	1/50 Femoral	1/50 CMLV	<u>IHQ</u> : anti-IgG ratón 1/200 <u>IF</u> : anti-IgG ratón 1/200
<b>anti-<math>\alpha</math>-SMA</b>	Abcam (ab5694)	Conejo	1/500 Femoral, Arteria conoraria humano		anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-calponina</b>	Abcam (ab46794)	Conejo	1/100 Arteria conoraria humano		anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-TWEAK</b>	Abcam (ab37170)	Conejo	1/100 Arteria conoraria humano		anti-IgG conejo 1/500
<b>anti-Fn14</b>	Abcam (ab109365)	Conejo	1/50 Arteria conoraria humano		anti-IgG conejo 1/200

<b>anti-PCNA</b>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7907)	Conejo	1/200 Arteria conoraria humano		anti-IgG conejo 1/500
------------------	--	--------	---	--	--------------------------

**Tabla 4: Anticuerpos utilizados para los análisis histológicos.**

#### 12.4. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas, inmunofluorescencias y tinciones.

Los análisis morfométricos asistidos por ordenador se realizaron con el software Image-ProPlus (versión 4.5.0 para Windows). El umbral para la medición del área positiva fue igual para todas las imágenes. Las muestras de cada animal se examinaron de forma ciega. Los resultados se expresaron como % de área positiva versus área total (colágeno, macrófagos,  $\alpha$ -actina, ciclina D1, CDK4, CDK6 y p15<sup>INK4B</sup>), % de células positivas para PCNA o CD68 versus células totales.

### 13. RNA-Seq

#### 13.1. Construcción y secuenciación de bibliotecas de RNA-seq.

Las bibliotecas de ARN-Seq se prepararon utilizando la preparación de la biblioteca de ARN total Illumina TruSeq, después de la ribodepleción con el kit Epicenter Ribozero Gold (cat # RZE1224) a partir de 500 ng de ARN tratado con ADNsA I, siguiendo el protocolo del fabricante, con la excepción de que se realizaron 14 ciclos de PCR para amplificar las bibliotecas, para mantener la tasa de duplicación más baja que con los 15 ciclos recomendados. Las bibliotecas amplificadas se purificaron usando perlas AMPure, cuantificadas por Qubit y qPCR, y visualizadas en un bioanalizador Agilent. Las bibliotecas se agruparon equimolarmente y se cargaron en una celda de flujo Illumina HiSeq 2500. El software estadístico R se usó para ejecutar el paquete Bioconductor, DESeq2 para analizar el conjunto de datos de ARN-Seq para la expresión diferencial entre grupos (Laboratorio de Bioinformática Aplicada, NYU School of Medicine, Nueva York, EE. UU.).

#### 13.2. Enriquecimiento del conjunto de genes.

Se utilizó un método para el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes basado en la regresión logística (Montaner & Dopazo, 2010) implementado en el conjunto de Babelomics (Alonso et al., 2015) para extraer los términos GO (procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares) y vías KEGG (anotación extraída usando el servicio KEGG; *Kyoto Encyclopedia of genes and genomes*) sobrerrepresentadas en cada una de las condiciones. Se usó un umbral de valor p ajustado por FDR <0.05 para seleccionar los términos GO significativos y la ruta KEGG.

#### 13.3. Modulo funcional de extracción y enriquecimiento funcional.

La herramienta web NetworkMiner (García-Alonso et al., 2012) implementada en la suite Babelomics (Alonso et al., 2015) se utilizó para extraer las redes de interacción proteína-proteína relevantes asociadas a cada una de las dos condiciones comparadas. La entrada para NetworkMiner

fue la lista de genes identificados en el experimento RNASeq clasificados por el parámetro estadístico del análisis DeSeq2. Utilizamos el interactoma "All ppis" (versión de genes), permitiendo la entrada de una proteína intermedia externa (no identificada en nuestro RNA-Seq). El algoritmo FatiGO (Al-Shahrour et al., 2007) se aplicó para realizar el análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas en cada una de las redes (excluyendo los nodos huérfanos). Ejecutamos FatiGO utilizando términos GO (procesos biológicos) como anotación y el interactoma utilizado para el análisis de NetworkMiner como la lista de referencia de genes. Se consideró un valor de p-valor ajustado por FDR <0.05 para la significación estadística.

#### 14. Análisis estadístico.

Los datos representados se expresan como media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la distribución normal. El estudio estadístico se realizó usando el test Mann-Whitney o one-way ANOVA seguido del análisis posterior de Bonferroni en el caso de los modelos animales (para modelos de >3 grupos), o mediante el estudio t de Student para los estudios *in vitro*. Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente a partir de  $p < 0.05$ . El número de animales utilizados en cada estudio aparece detallado en cada modelo. Los experimentos *in vitro* se realizaron al menos 3 veces. El análisis de datos se realizó con GraphPad Prism Software Versión 7 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

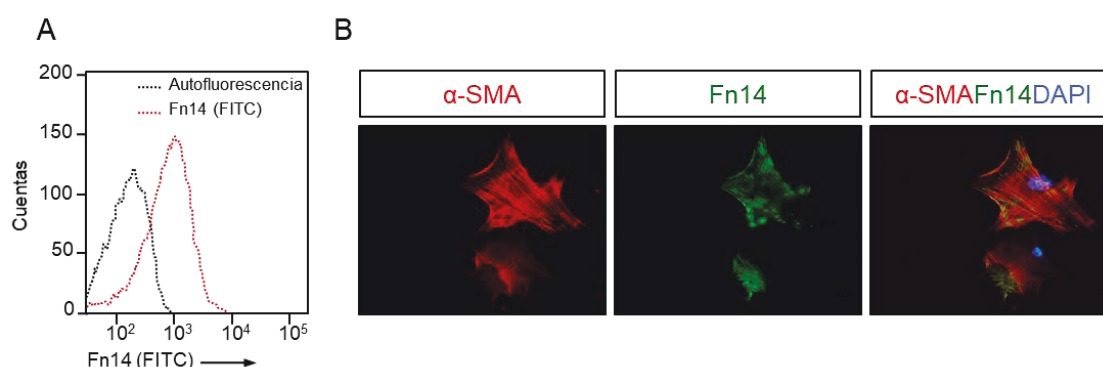
# ***RESULTADOS***

## Resultados

### 1. El eje TWEAK/Fn14 como diana terapéutica en la reestenosis post-angioplastia.

#### 1.1. TWEAK modula la expresión de genes asociados a la proliferación celular en CMLV.

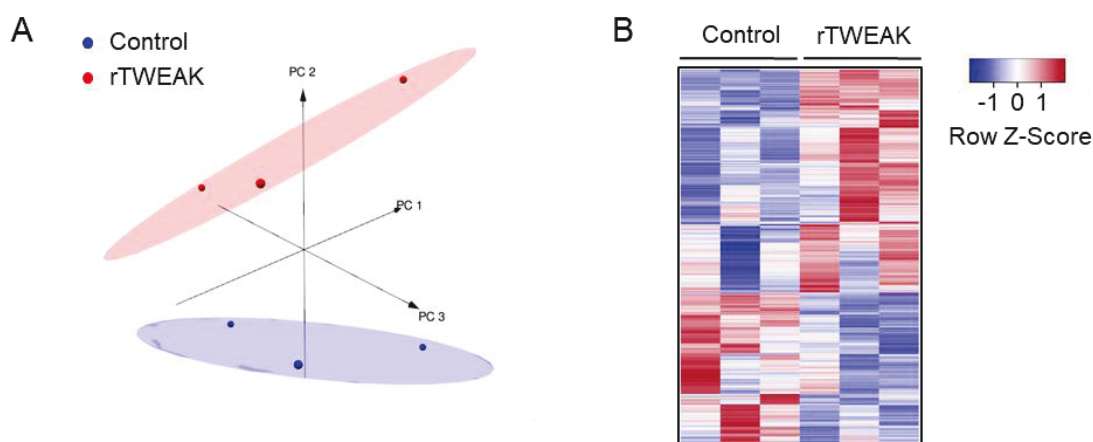
Recientemente se ha demostrado que el eje TWEAK/Fn14 tiene un papel clave durante el remodelado vascular (Méndez-Barbero et al., 2020). Sin embargo, dado que los mecanismos y mediadores moleculares no se encuentran descritos en su totalidad, nuestro objetivo inicial fue identificar genes modulados por TWEAK en CMLV. Para ello, se extrajeron CMLV provenientes de aortas de ratones salvajes y se incubaron en presencia o ausencia de TWEAK humano recombinante (rTWEAK; 100 ng/ml) durante 24 horas. Previamente, analizamos mediante técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia la expresión de Fn14, el receptor funcional de TWEAK, en estas CMLV y corroboramos como las CMLV positivas para  $\alpha$ -SMA expresan Fn14 (Fig. 11A-B).



**Figura 11: Expresión de Fn14 en CMLV de aortas de ratones salvajes. A)** Análisis de citometría de flujo de la expresión de Fn14 en CMLV cultivadas. **B)** Fotografías representativas de la doble inmunofluorescencia de  $\alpha$ -SMA y Fn14 en CMLV cultivadas. Barra de escala de 50  $\mu$ m.

La dosis de rTWEAK utilizada se seleccionó en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Muñoz-García et al., 2009; Tarín et al., 2014). Con el ARN obtenido de las CMLV estimuladas con rTWEAK se realizaron estudios de secuenciación masiva de ARN (ARN-Seq) con el objetivo de analizar los cambios en el transcriptoma de dichas células. El análisis del perfil transcriptómico reveló la existencia de 2702 genes expresados diferencialmente en las CMLV incubadas con rTWEAK, entre los cuales, 1611 genes aumentaban su expresión y 1091 la disminuían (Fig. 12). El elevado número de genes regulados significativamente excedía el rango para realizar un análisis de enriquecimiento clásico, lo que nos llevó a realizar en su lugar un análisis de enriquecimiento del conjunto. En este sentido, se observaron 984/1032 procesos biológicos, 10/10 funciones moleculares, 6/6 componentes celulares y 62/92 rutas KEGG sobrerrepresentadas en

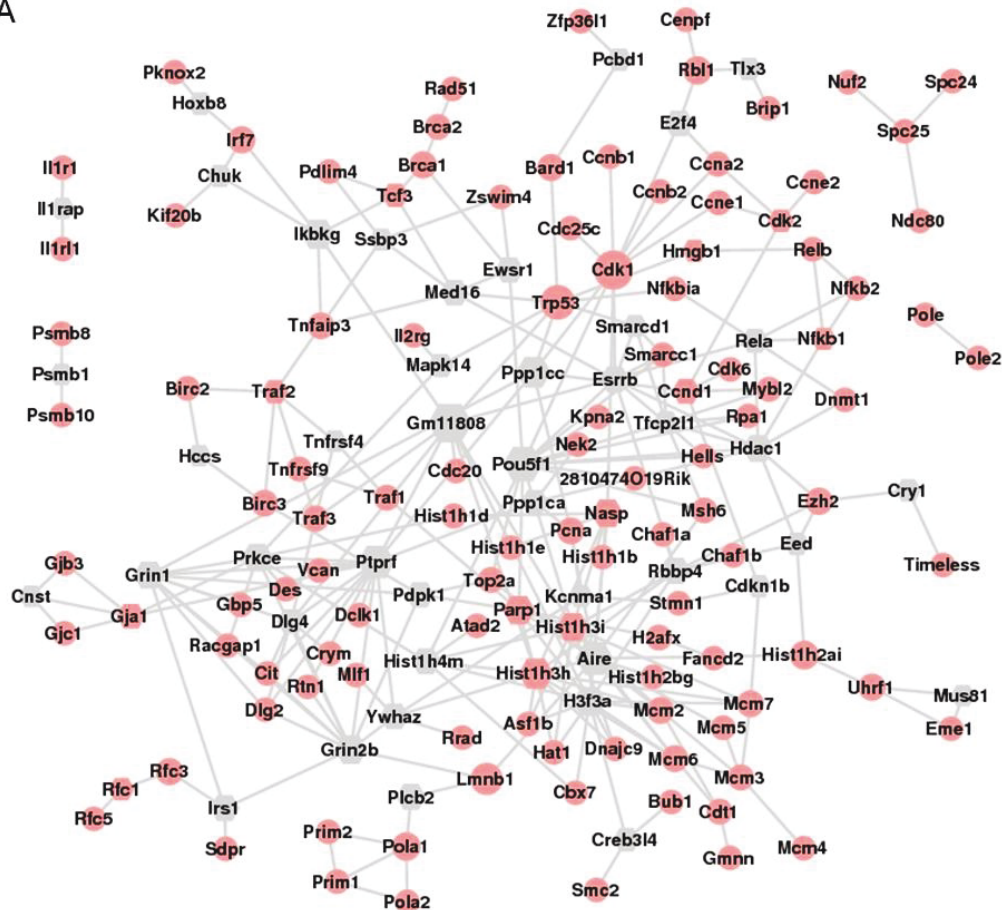
condiciones de estimulación con rTWEAK versus control (Fig.13). Posteriormente, se realizó un análisis de conjuntos de genes por módulos funcionales, con el objetivo de analizar los procesos celulares significativamente regulados por TWEAK en CMLV, utilizando el algoritmo NetworMiner (García-Alonso et al., 2012). Este método extrae módulos funcionales asociados a un fenotipo evaluando tanto la solidez topológica de una red de interacción de proteína-proteína como el vínculo de sus componentes a una condición. Los módulos se presentan como redes de proteínas y el nivel de significación se obtiene de una comparación con las redes generadas a partir de listas aleatorias de genes. Interesantemente, la red resultante puede contener proteínas no necesariamente marcadas como asociadas al fenotipo por el análisis de expresión, pero importantes en la estructura interna del módulo funcional.



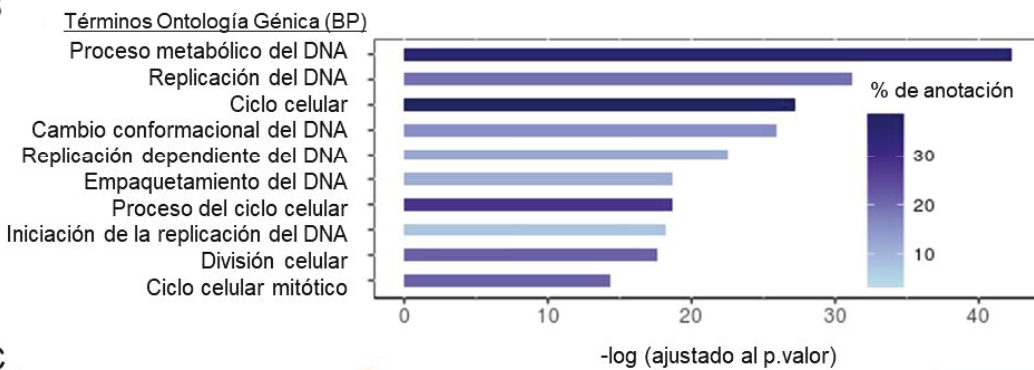
**Figura 12: Análisis de ARN-Seq de genes expresados diferencialmente entre CMLV tratadas o sin tratar con TWEAK. A)** Análisis de componentes principales de CMLV incubadas 24 horas en presencia o ausencia de rTWEAK (N = 3) basado en los niveles de expresión génica de la secuenciación masiva de ARN. Código de colores según el grupo de ratones. **B)** Mapa de calor que representa genes expresados diferencialmente entre CMLV tratadas y no tratadas con TWEAK (solo genes con valor p ajustado por FDR <0.05). C = control; TW = rTWEAK.

Obtuvimos dos redes de interacción de proteínas importantes vinculadas a genes regulados de manera aumentada o disminuida por TWEAK. La red asociada a la regulación positiva por rTWEAK en CMLV (Fig. 13A) contenía 159 proteínas conectadas (116 reguladas significativamente en el análisis de expresión) que se enriquecen en términos de ontología génica y están relacionadas con proliferación celular (Fig. 13B). También encontramos una red más pequeña pero significativa de genes regulados negativamente por rTWEAK asociados con procesos de unión al ADN, regulación de histonas, desarrollo y ciclo celular (Fig. 13C).

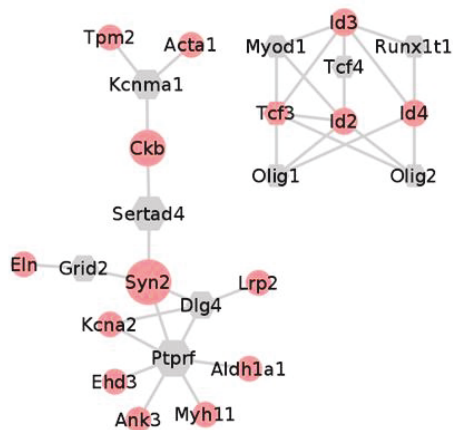
A



B



C

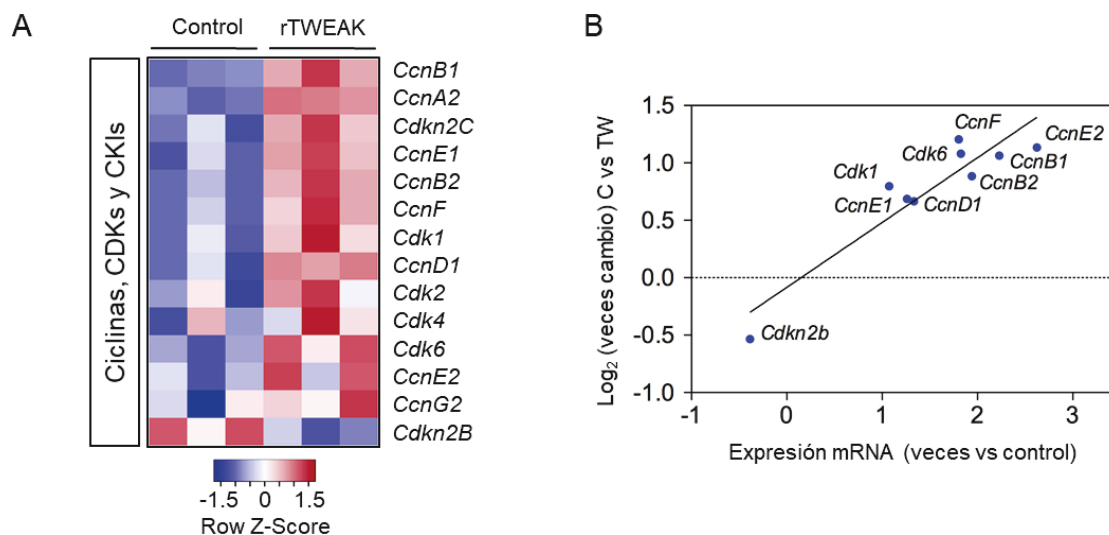


**Figura 13: Redes vinculadas a genes expresados diferencialmente en CMLV tratadas con TWEAK. A)** Red vinculada a genes sobre expresados por rTWEAK en CMLV. **B)** Los diez términos principales de Ontología génica



(procesos biológicos) sobrerrepresentados significativamente (valor p ajustado por FDR <0.05) en el conjunto de proteínas de la red asociada a genes regulados por TWEAK. **C)** Red vinculada a genes regulados negativamente por rTWEAK en CMLV.

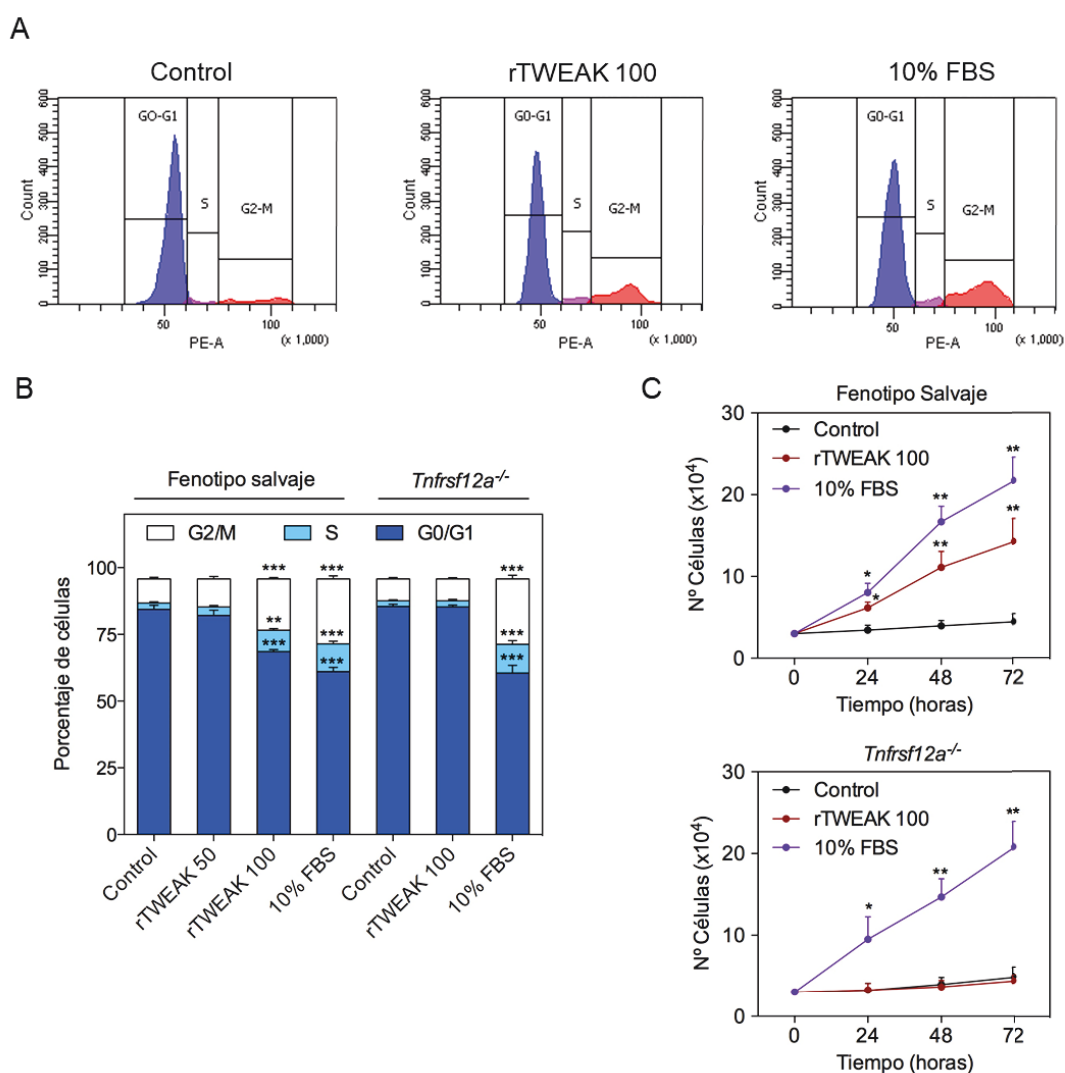
Dado que la mayoría de los términos de ontología génica obtenidos estaban relacionados con proliferación celular, analizamos la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular. Durante el ciclo celular, la progresión de fase G1 a fase S está modulada por el equilibrio entre los reguladores positivos del ciclo celular [ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK)] y los inhibidores de ciclinas (CDKI) (Charles J. Sherr & Roberts, 2004). La figura 14 muestra a través de un mapa de calor las ciclinas, CDK y CDKI expresadas diferencialmente en CMLV tratadas o sin tratar con rTWEAK obtenidas del análisis de ARN-Seq. Para confirmar los resultados obtenidos en el ARN-Seq, se validaron de forma independiente los distintos genes asociados con la proliferación celular (*Ccn B1, B2, D1, E1, E2 y F, Cdk1, Cdk4 y Cdk6 y Cdkn2b*) mediante RT-qPCR. Observamos una excelente correlación entre los hallazgos de ARN-Seq y RT-PCR ( $r = 0.80$ ;  $p = .006$ ; correlación de Pearson; Fig. 14B). Además, se observó que *Cdkn2b*, un gen regulador del ciclo celular y supresor de tumores que se encuentra altamente conservado, se encontraba significativamente disminuido por TWEAK en CMLV (Fig. 14A-B). Todos estos datos sugieren que la señalización por TWEAK contribuye a la proliferación de CMLV, por lo que decidimos analizar el papel de TWEAK en la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo*.



**Figura 14: Análisis de ARN-Seq de genes relacionados con el control del ciclo celular expresados diferencialmente entre CMLV tratadas con o sin TWEAK. A)** El mapa de calor muestra ciclinas (*Ccn*), quinasas dependientes de ciclina (*Cdk*) e inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (*Cdkn*) regulados por TWEAK en CMLV (ajustado  $p < 0.05$ ). **B)** Validación por RT-qPCR de genes seleccionados identificados por ARN-Seq. Los datos de RT-qPCR representados como aumento frente a células no estimuladas de tres réplicas en duplicado experimental normalizadas a la expresión de GADPH. Gráfico de dispersión que muestra la relación positiva significativa entre la expresión del gen de ARNm seleccionado obtenido por ARN-Seq y RT-qPCR. Correlación de Pearson.  $r = 0.80$ ;  $p = .006$ .

## 1.2. TWEAK aumenta la proliferación y migración de CMLV.

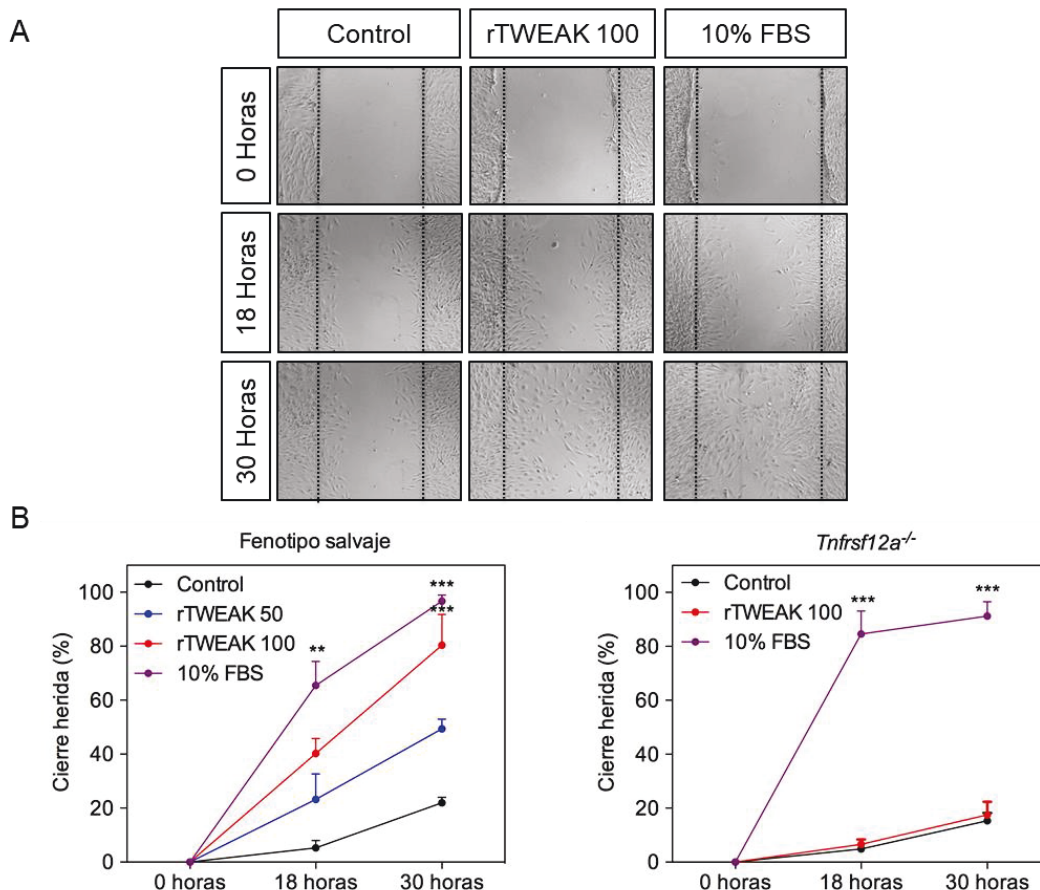
Para determinar si TWEAK regula la proliferación de CMLV, analizamos el ciclo celular de las CMLV estimuladas con rTWEAK midiendo el contenido de ADN de las células mediante tinción con yoduro de propidio y por citometría de flujo. Como control positivo de la proliferación celular se utilizaron células en condiciones de crecimiento en presencia de FBS al 10%. Los resultados mostraron una disminución del número de células en fase G0/G1 y un aumento de las células en fase S y G2/M en las CMLV estimuladas con rTWEAK durante 18 horas (Fig. 15A-B). Sin embargo, rTWEAK no pudo inducir la transición de fase G0/G1 a fase S en CMLV de ratones deficientes en el receptor de funcional de TWEAK (*Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup>), Fn14 (Fig. 15A-B), lo que indica que TWEAK activa la proliferación celular a través de su receptor. Consistentemente con estos datos, el número de células aumentó exponencialmente con el tiempo de incubación de rTWEAK (Fig. 15C), lo que no se observó en las CMLV de animales *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> (Fig. 15C).

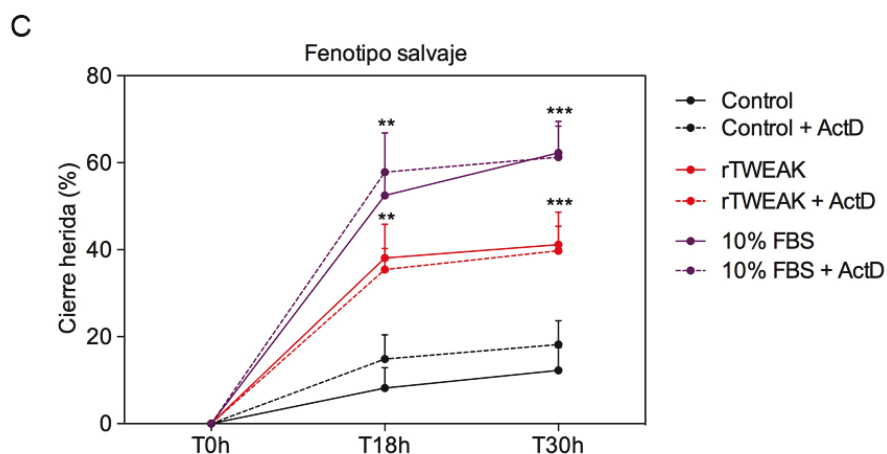


**Figura 15: TWEAK aumenta la proliferación de CMLV.** **A)** Análisis del ciclo celular de CMLV por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo después de 18 horas de tratamiento. Control (0% FBS), rTWEAK (100 ng/mL) y control positivo (10% FBS). **B)** El porcentaje de CMLV en fase G0/G1, S o G2/M del ciclo celular después de 18 horas de incubación con 0% de FBS (Control), rTWEAK (50–100 ng/mL) o 10% de FBS. Los datos representan la

media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student). \*\*  $p < .01$  vs Control y \*\*\*  $p < .001$  vs Control). **C)** Curva proliferativa de CMLV WT o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> cultivadas en presencia de 0% de FBS (Control), rTWEAK (100 ng/ml) o 10% de FBS de 0 a 72 horas después de la inanición sérica. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs Control y \*\*  $p < .01$  vs Control).

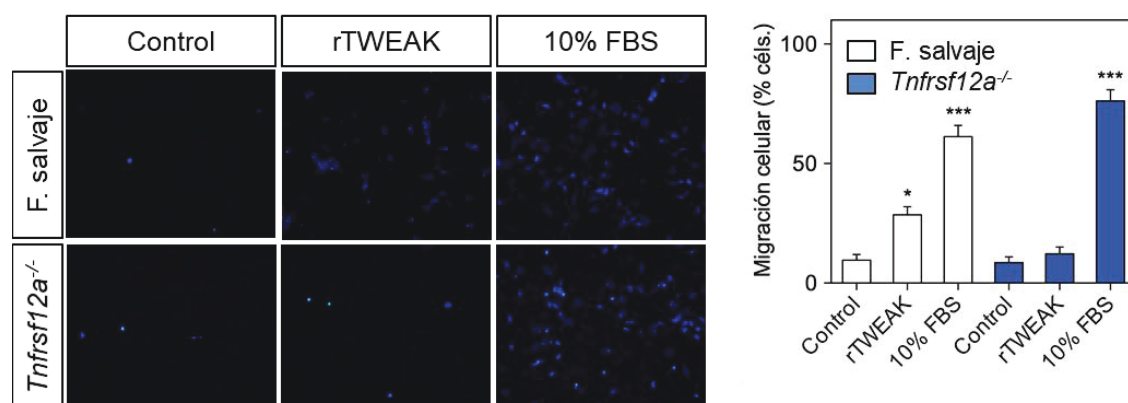
A continuación, realizamos ensayos de cierre de herida en CMLV procedentes de ratones de tipo salvaje (WT) y *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> para analizar el papel de TWEAK en la migración celular. En CMLV salvajes y *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> crecidas a una confluencia máxima se realizó una única herida por raspado y las células se incubaron durante 18 a 30 horas en presencia de 0.5% de FBS (control), rTWEAK (50–100 ng/mL + 0.5% de FBS) o 10% de FBS (control positivo). Las CMLV estimuladas con rTWEAK de ratones WT migraron en el área raspada de manera eficiente, mientras que las CMLV de ratones *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> no migraron en respuesta a rTWEAK (Fig. 16A–B). Para confirmar que TWEAK induce la migración de CMLV, las células se preincubaron 30 minutos en presencia o ausencia de actinomicina D (ActD; 0,01  $\mu$ g/mL) a una concentración antiproliferativa y no apoptótica para inhibir la proliferación de las CMLV (Wu et al., 2005). En este caso, las CMLV estimuladas con rTWEAK volvieron a migrar y ocupar el área raspada en presencia de ActD, lo que indica que TWEAK induce la migración de CMLV (Fig. 16C).





**Figura 16: TWEAK aumenta la migración de CMLV. A)** Imágenes representativas de la migración de CMLV en el ensayo de cierre de heridas. Se realizó una única herida de raspado en CMLV de tipo salvaje o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup>. Luego, las células se incubaron durante 18 a 30 horas en presencia de 0.5% de FBS (control), rTWEAK (50–100 ng/mL + 0.5% de FBS) o 10% de FBS (control positivo). Las imágenes del cierre de la herida se realizaron y analizaron usando un microscopio invertido. Barras de escala de 200  $\mu$ m. **B)** La migración de CMLV se cuantificó por porcentaje de cierre de la herida a lo largo del tiempo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student) \*\*  $p < .01$  vs Control y \*\*\*  $p < .001$  vs Control. **C)** Las células se incubaron durante 18 a 30 horas en presencia de 0.5% de FBS (control), rTWEAK (50–100 ng/mL + 0.5% de FBS) o 10% de FBS en presencia o ausencia de ActD (0,01  $\mu$ g/mL). Datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. Prueba t de Student. \*\*  $p < 0,01$  vs Control y \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control.

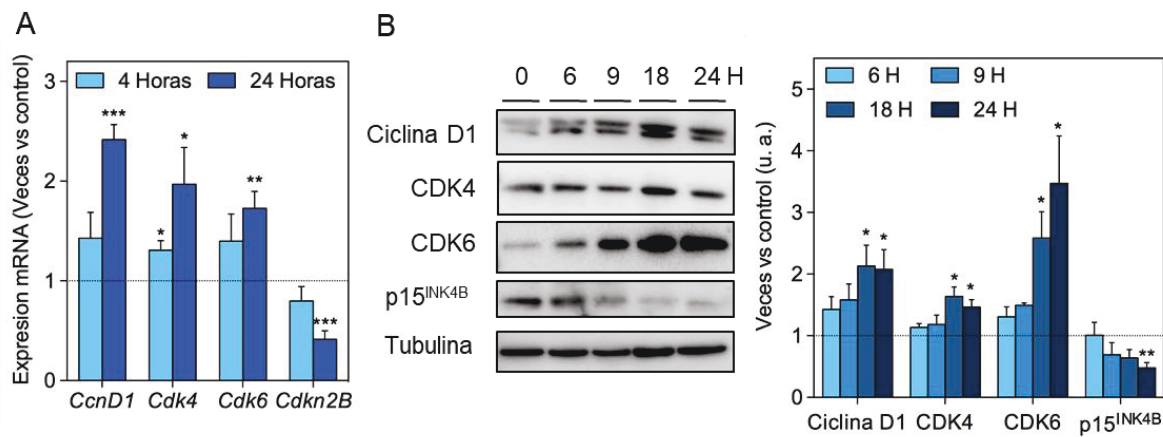
Para confirmar estos resultados, realizamos ensayos de migración en transwell, en los que se sembraron CMLV WT o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> en cámaras de quimiotaxis y se estimularon con 0.5% de FBS (control), rTWEAK (100 ng/mL + 0.5% de FBS) o 10% de FBS (control positivo). Las CMLV WT migraron eficientemente mientras que las CMLV de *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> tratadas de igual manera no lo hicieron (Fig. 17). En conjunto, nuestros resultados demuestran que TWEAK induce la proliferación y migración de CMLV de manera dependiente de la unión a su receptor funcional Fn14.

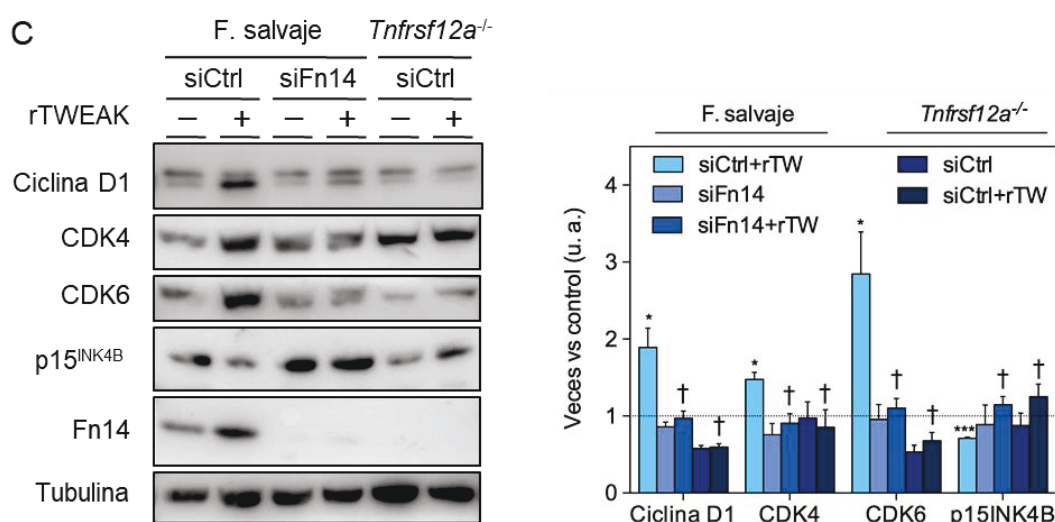


**Figura 17: TWEAK aumenta la migración de CMLV.** Se sembraron CMLV WT o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> en la superficie superior de las cámaras de quimiotaxis y se estimularon con 0.5% de FBS (control), rTWEAK (100 ng/mL + 0.5% de FBS) o 10% de FBS (control positivo). Cuantificación de células migradas en diez campos por condición. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs Control y \*\*\*  $p < .001$  vs Control. Barras de escala de 20  $\mu$ m.

Una vez comprobado que TWEAK activaba la proliferación de CMLV, analizamos la expresión de genes regulados por TWEAK identificados mediante ARN-Seq para obtener una visión más mecanística de los efectos de TWEAK. Como se comentó anteriormente, *Cdkn2b* ( $p15^{INK4B}$ ), un gen regulador de ciclo celular y gen supresor de tumores altamente conservado, estaba regulado negativamente por TWEAK en los estudios de ARN-Seq y RT-qPCR. Se realizaron estudios de cinética de tiempos en CMLV WT que mostraron como rTWEAK disminuía la expresión a nivel de ARNm (*Cdkn2B*) y a nivel de proteína ( $p15^{INK4B}$ ) de manera dependiente de tiempo (Fig. 18A-B). Además, esta regulación de  $p15^{INK4B}$  dependía de la presencia de Fn14, ya que TWEAK no modifico la expresión  $p15^{INK4B}$  en CMLV transfectadas con ARN silenciador de Fn14 o CMLV *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> (Fig. 18C).

La transición de la fase G1 a la S del ciclo celular está regulada por ciclinas de tipo D y se ha demostrado que  $p15^{INK4B}$  es un inhibidor de la expresión de CDK4/CDK6 y ciclina D1 en CMLV (Mathew et al., 2010). Por lo tanto, analizamos la expresión de ARNm de *CcnD1* (ciclina D1), *Cdk4* y *Cdk6* en CMLV estimuladas con rTWEAK. En línea con Mathew et al. (Mathew et al., 2010), rTWEAK aumentó la expresión de ARNm de *CcnD1*, *Cdk4* y *Cdk6* (Fig. 18A) así como los niveles de proteínas de una manera dependiente del tiempo (Fig. 18B). La regulación positiva de ciclina D1, CDK4 y CDK6 también era dependiente de Fn14 ya que TWEAK no pudo regular estas proteínas en CMLV *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o CMLV de tipo salvaje transfectadas con ARN silenciador de Fn14 (Fig. 18C).



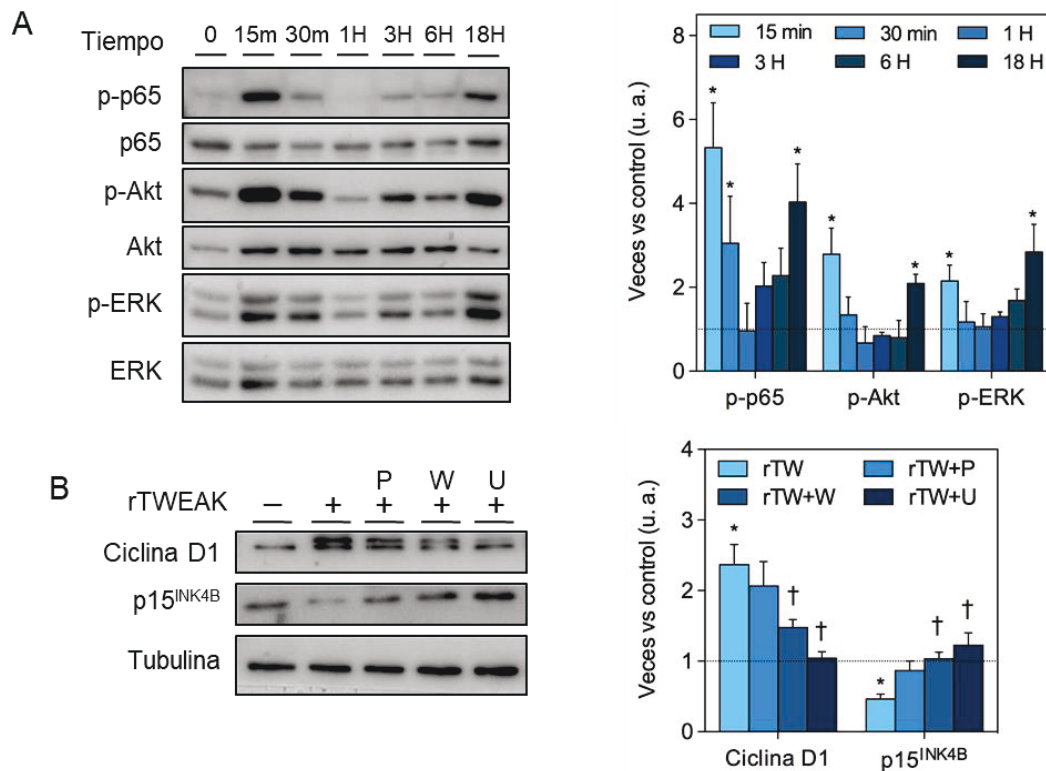


**Figura 18: TWEAK regula la expresión de ciclina D1, CDK4, CDK6 y p15<sup>INK4B</sup> en CMLV.** **A)** Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de *CcnD1*, *Cdk4*, *Cdk6* y *Cdkn2B* en CMLV tras estimulación con rTWEAK (100 ng/ml). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs 0h, \*\*  $p < .01$  vs 0h y \*\*\*  $p < .001$  vs 0h). **B)** Análisis de Western blot de ciclina D1, CDK4, CDK6 y p15<sup>INK4B</sup> en CMLV WT. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs 0h, \*\*  $p < .01$  vs 0h). **C)** Análisis de Western blot de *CcnD1*, CDK4, CDK6, p15<sup>INK4B</sup> y Fn14 en CMLV WT o *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> transfectadas con control negativo ARNs (siCtrl) o Fn14 ARNs después de 18 horas de estimulación con rTWEAK (100 ng/ml). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs siControl, \*\*\*  $p < .001$  vs siControl. †  $p < .05$  vs siControl + rTWEAK).

### 1.3. La expresión de p15<sup>INK4B</sup> y ciclina D1 está regulada por ERK1/2 y Akt en CMLV.

Para analizar los mecanismos moleculares por los cuales TWEAK regula la expresión de p15<sup>INK4B</sup> y ciclina D1 en CMLV, estudiamos diferentes vías de señalización asociadas al control de la proliferación celular como son; la vía de ERK, Akt, o NF- $\kappa$ B. TWEAK indujo la fosforilación de ERK 1/2, Akt y p65 (subunidad de NF- $\kappa$ B), con una activación dual a los 15 minutos y 18 horas (Fig. 19A). Para analizar la importancia de cada una de ellas en la expresión de p15<sup>INK4B</sup> y ciclina D1 mediada por TWEAK, utilizamos los inhibidores específicos UO126 (ERK 1/2), wortmanina (Akt) y partenolide (NF- $\kappa$ B). Tanto el inhibidor de ERK 1/2 como el de Akt impidieron la regulación negativa de p15<sup>INK4B</sup> y el aumento de ciclina D1 inducida por TWEAK (Fig. 19B). Sin embargo, no se observó ningún efecto con el inhibidor de NF- $\kappa$ B (partenolide) (Fig. 19B).



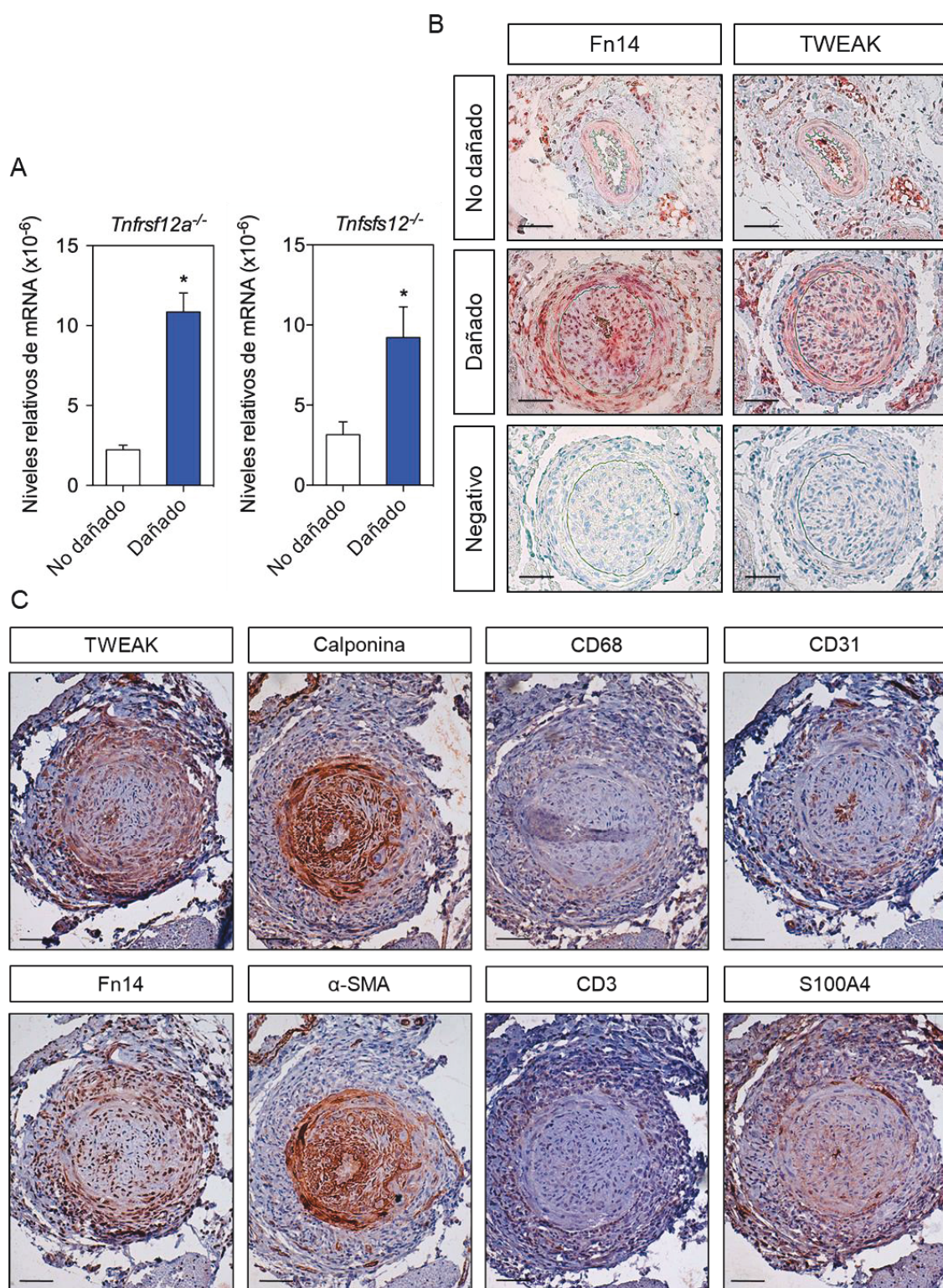


**Figura 19: ERK1/2 y Akt regulan la expresión de ciclina D1 y p15<sup>INK4B</sup> en CMLV.** **A)** Análisis de Western blot de ERK, Akt y fosforilación de p65 en CMLV WT tras estimulación con rTWEAK (100 ng/ml). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs 0h. **B)** Análisis de Western blot que muestra el efecto de partenolide (P), wortmanina (W) y UO126 (U) sobre la expresión de ciclina D1 y p15<sup>INK4B</sup>. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (prueba t de Student) \*  $p < .05$  vs control; †  $p < .05$  vs rTWEAK.

#### 1.4. La pérdida de *Tnfrsf12a* o *Tnfsf12* disminuye la formación neointimal en la arteria femoral después de una lesión con guía de angioplastia.

La migración de CMLV de la capa media a la capa íntima de la pared vascular y su posterior proliferación, son una manifestación patológica característica de la reestenosis vascular post-angioplastia (Berk, 2001). Para corroborar los hallazgos *in vitro*, planteamos evaluar el papel funcional del eje TWEAK/Fn14 *in vivo* en un modelo de daño vascular en el que la proliferación y migración de CMLV es fundamental. Para este fin, realizamos un modelo de daño femoral en ratón que imita el daño causado por la angioplastia en humanos (Roque et al., 2000). Por medio de la introducción de una guía de 0,25 mm en la arteria femoral de ratón, generamos una desendotelización y daño en la pared del vaso que implica un remodelado vascular con formación de neointima. El daño mecánico producido por la guía de angioplastia incrementó los niveles de expresión de TWEAK y Fn14 después de 14 días de lesión en ratones WT en comparación con las arterias no lesionadas (Fig. 20A-B). El análisis mediante inmunohistoquímica también mostró una localización predominante de la expresión de TWEAK y Fn14 en las células de las capas media y neointimal (Fig. 20B). Además, se observa que la

mayoría de las células presentes en la neointima fueron doblemente positivas para marcadores de CMLV como  $\alpha$ -SMA y calponina, y para TWEAK y Fn14 (Fig. 20C), lo que indicarían que el fenotipo *in vivo* observado en nuestro modelo animal depende principalmente de la actividad de las CMLV.

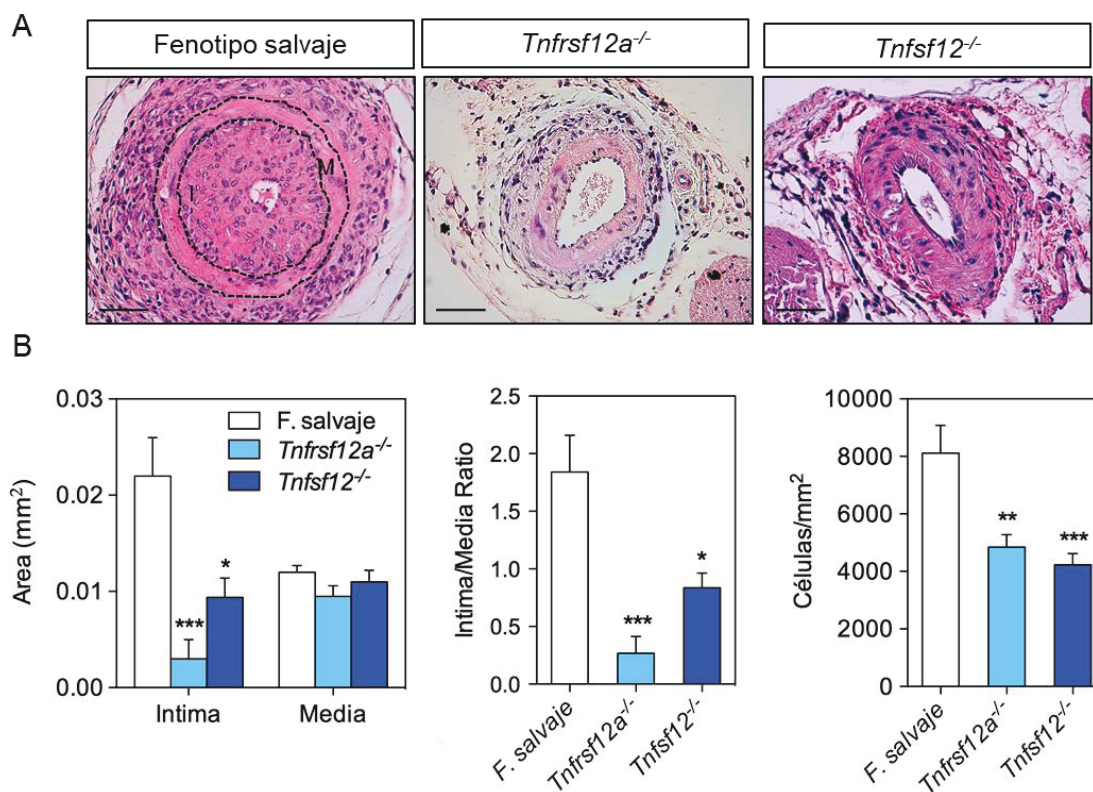


**Figura 20: TWEAK participa en la formación neointimal después de una lesión producida con guía de angioplastia en la femoral de los ratones. A)** Niveles de expresión relativos de *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfsf12*<sup>-/-</sup> normalizados con el 18S ARNr de la arteria femoral no lesionada (N = 4) o lesionada (N = 5) de ratones salvaje. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (prueba de la t de Student) \* p < .05 vs arteria no lesionada. **B)** Imágenes



representativas de inmunohistoquímicas específicas para Fn14 y TWEAK en secciones transversales de la arteria femoral no lesionadas y lesionadas. Los controles negativos se incubaron con IgG no específica. Barras de escala de 50  $\mu$ m. **C)** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas específicas para; CMLV ( $\alpha$ -SMA y calponina), fibroblastos (S100A4), células endoteliales (CD31), linfocitos T (CD3), macrófagos (CD68), TWEAK y Fn14 en secciones seriadas de arteria femoral lesionada de ratones salvajes. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

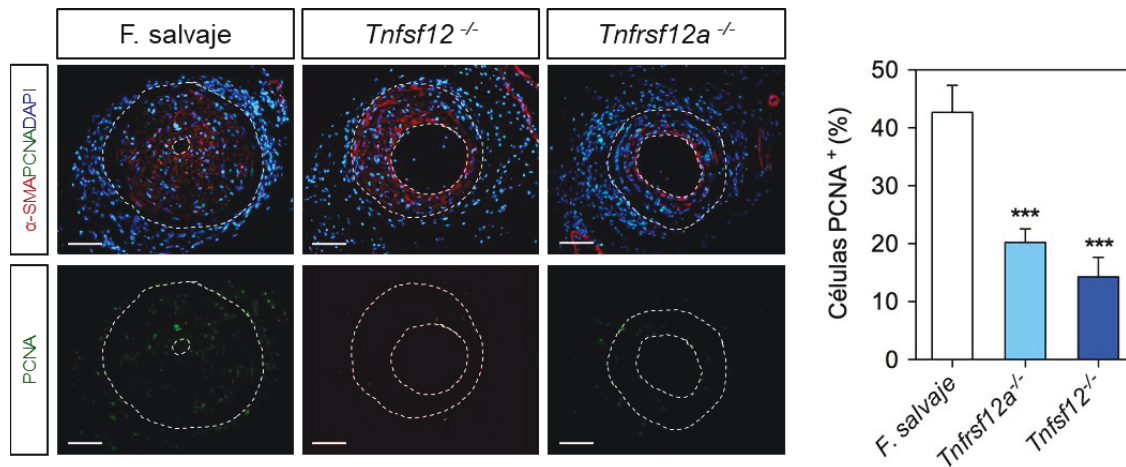
A continuación, y para analizar el papel del eje TWEAK/Fn14 en este remodelado vascular, se lesionaron con alambre guía arterias femorales de animales deficientes en *Tnfrsf12a* y *Tnfsf12*. La cuantificación del área lesionada (neoíntima) derivada de la introducción del alambre fue determinada por el análisis del área de la íntima, y la relación íntima/media. Se observó que los ratones *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> y *Tnfsf12*<sup>-/-</sup> presentaban áreas de la íntima, y relación íntima/media significativamente menores que los ratones WT (Fig. 21A-B). Además, el número de células por mm<sup>2</sup> también era menor en las secciones femorales de ratones *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfsf12*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones WT (Fig. 21B).



**Figura 21: TWEAK participa en la formación de neoíntima en un modelo de daño femoral en ratón.** **A)** Imágenes representativas de secciones transversales de la arteria femoral lesionada teñidas con hematoxilina y eosina de ratones salvajes, *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfsf12*<sup>-/-</sup>. Barras de escala de 50  $\mu$ m. M = media; I = íntima. **B)** Cuantificación del número de células por mm<sup>2</sup>, área íntima y media, y relación íntima/media de secciones transversales de arterias femorales lesionadas de tipo salvaje (N = 11), *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> (N = 11) o *Tnfsf12*<sup>-/-</sup> (N = 10) ratones. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni) \* p <.05 vs WT, \*\* p <.01 vs WT y \*\*\* p <.001 vs WT.

Analizamos la proliferación *in vivo* en secciones de arterias femorales lesionadas y observamos como el número de células positivas para antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) era

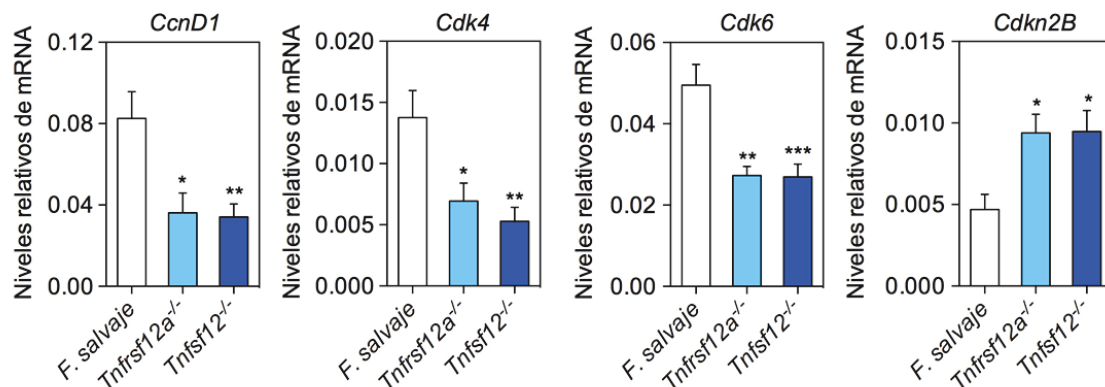
significativamente menor en femorales de ratones deficientes para TWEAK y FNN14 (*Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup>) en comparación con ratones WT (Fig. 22).

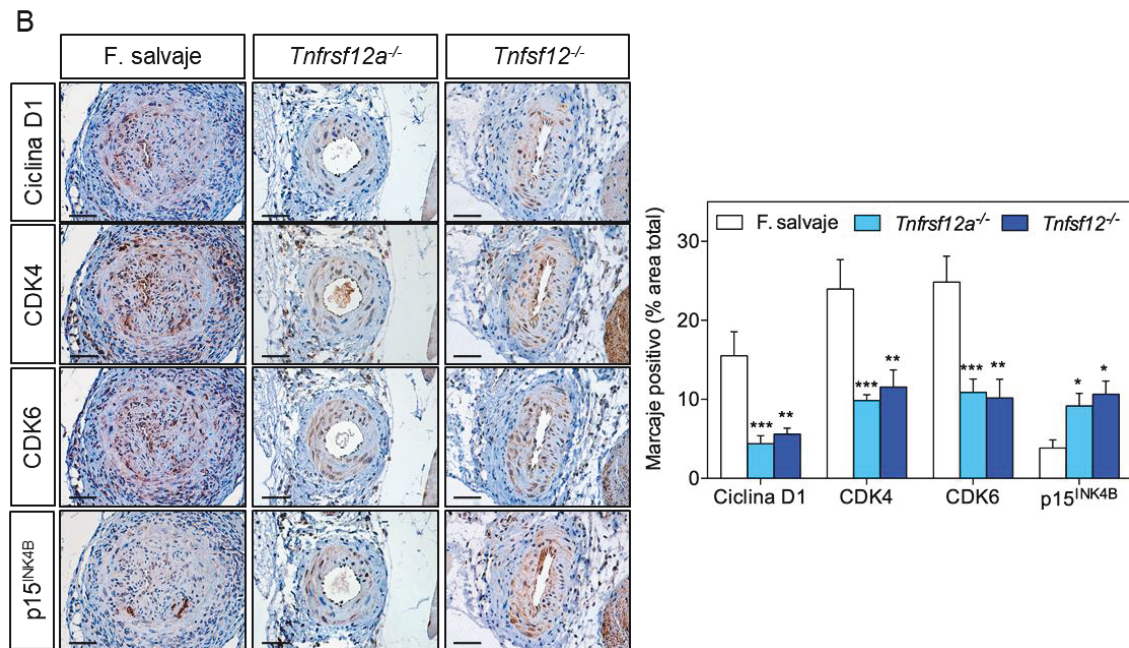


**Figura 22: TWEAK aumenta la proliferación *in vivo*.** Imágenes representativas y cuantificación de células PCNA positivas en secciones transversales de arterias femorales lesionadas de ratones tipo salvaje (N = 9), *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> (N = 11) o *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup> (N = 10). Los datos representan la media ± SEM (ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni) \*\*\* p < .001 vs WT. Barras de escala de 50 µm.

Posteriormente, analizamos si la ausencia de TWEAK o Fn14 afectaba a la expresión de los reguladores del ciclo celular. Los ratones deficientes en *Tnfrsf12a* o *Tnfrsf12* mostraron un aumento de *Cdkn2B* y una disminución en la expresión de *Cdk4*, *Cdk6* y *CcnD1* en arterias femorales lesionadas con respecto a ratones WT (Fig. 23A). Consistentemente, los niveles de las proteínas ciclina D1, CDK4 y CDK6 se redujeron notablemente y p15<sup>INK4B</sup> aumentó en las arterias femorales lesionadas de ratones deficientes en *Tnfrsf12a* o *Tnfrsf12* en comparación con ratones WT (Fig. 23B). Estos resultados indican que el eje TWEAK/Fn14 juega un papel clave en la formación de neointima a través de la regulación del ciclo celular mediante la reducción de la expresión de p15<sup>INK4B</sup> y el aumento de la expresión de CDK4/CDK6 y ciclina D1.

A

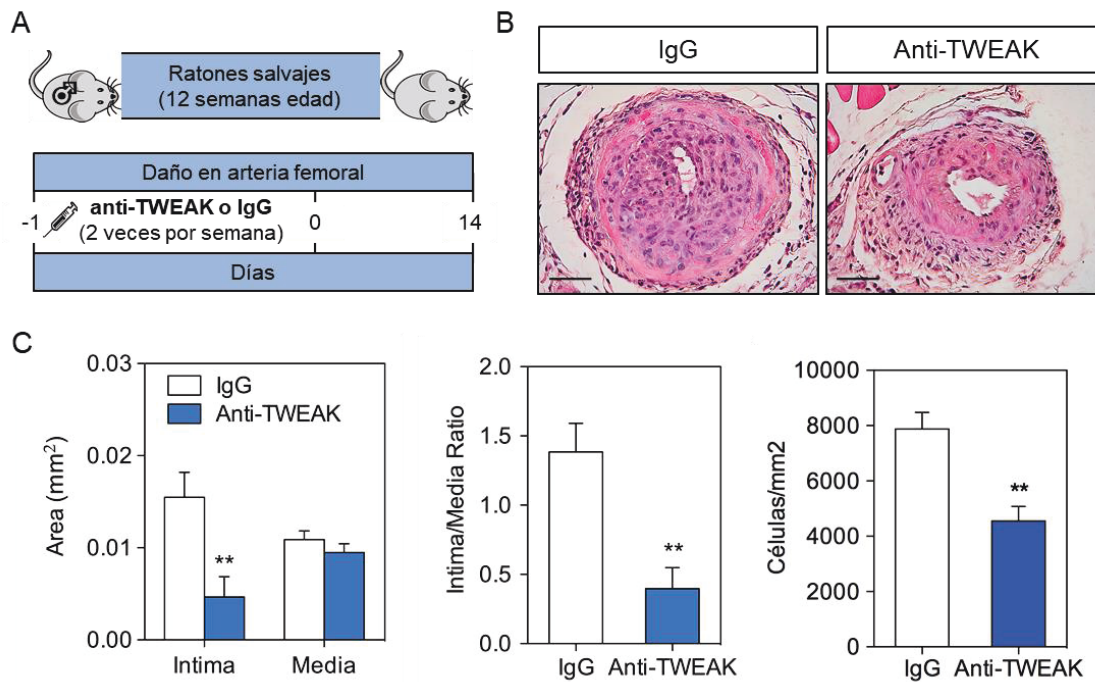




**Figura 23: TWEAK regula la proliferación *in vivo*.** **A)** Niveles de expresión de ARNm *CcnD1*, *Cdk4*, *Cdk6* y *Cdkn2B* relativos y normalizados a la expresión de ARNm de GAPDH de arterias femorales WT, *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup> lesionadas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (N = 8 por grupo) (ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni) \*  $p < .05$  vs WT, \*\*  $p < .01$  vs WT y \*\*\*  $p < .001$  vs WT. **B)** Imágenes representativas de tinción anti-ciclina D1, anti-CDK6, anti-CDK4 y anti-p15<sup>INK4B</sup> de secciones transversales de arterias femorales lesionadas de ratones WT, *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> o *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup>. Cuantificación del porcentaje de área intimal y medial positiva para la tinción de Ciclina D1, CDK6, CDK4 y p15<sup>INK4B</sup> respectivamente, en secciones transversales de la arteria femoral lesionada de WT (N = 11), *Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup> (N = 11) o *Tnfrsf12*<sup>-/-</sup> (N = 8). Barras de escala de 50  $\mu$ m. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni) \*  $p < .05$  vs WT, \*\*  $p < .01$  vs WT y \*\*\*  $p < .001$  vs WT.

### 1.5 El tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK reduce la formación de neointima después de una lesión post-angioplastia en la arteria femoral de ratón.

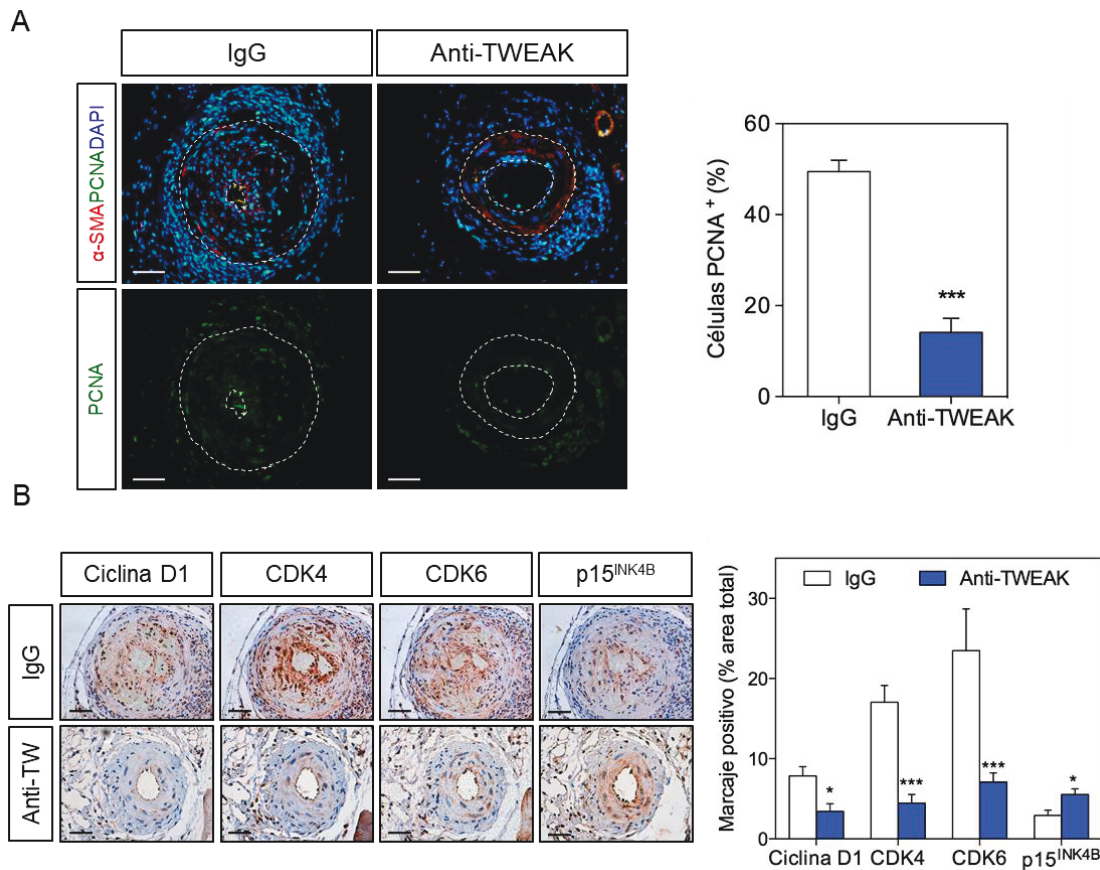
Para analizar el efecto protector de la terapia basada en TWEAK contra la hiperplasia neointimal inducida por lesión con guía de angioplastia, se lesionaron las arterias femorales de ratones salvajes y se trató a los ratones con mAb anti-TWEAK o IgG de control (10 mg/kg/dos veces por semana). Los ratones se trataron el día anterior a la realización del daño y dos veces por semana durante 14 días después del procedimiento (Fig. 24A) La formación de neointima determinada por el área de la íntima y la relación íntima/media disminuyó significativamente en los ratones tratados con anti-TWEAK en comparación con los tratados con IgG (Fig. 24B-C). Además, el número de células/mm<sup>2</sup> también se redujo en las secciones femorales de los ratones tratados con anti-TWEAK en comparación con los ratones tratados con IgG (Fig. 24B-C).



**Figura 24: El tratamiento anti-TWEAK inhibe la formación de neoíntima después de una lesión con guía de angioplastia en la arteria femoral de ratones salvajes.** **A)** Diseño experimental del ratón. Brevemente, las arterias femorales de ratones macho de tipo salvaje de 12 semanas de edad se dañaron y trataron con anti-TWEAK o IgG (10 mg/kg dos veces por semana) durante 14 días. **B)** Imágenes representativas de secciones transversales de la arteria femoral lesionada de ratones tratados con anti-TWEAK o IgG teñidos con hematoxilina y eosina. Barras de escala de 50  $\mu\text{m}$ . **C)** Cuantificación del número de células por  $\text{mm}^2$ , área íntima y media, y relación íntima/media de secciones transversales lesionadas mostradas en el apartado B. IgG (N = 10), anti-TWEAK (N = 14). Los datos representan la media  $\pm$  SEM (prueba U de Mann-Whitney) \*\*  $p < .01$  vs IgG.

De acuerdo con los datos obtenidos de ratones *Tnfsf12*<sup>-/-</sup>, las secciones transversales femorales de ratones tratados con anti-TWEAK mostraron una reducción del 71% en las células positivas en PCNA en comparación con los ratones tratados con IgG (Fig. 25A). Finalmente, se observó una reducción en la expresión de proteína de ciclina D1 y CDK4/CDK6 junto con niveles aumentados de p15<sup>INK4B</sup> en arterias femorales lesionadas de ratones tratados con anti-TWEAK en comparación con los tratados con IgG (Fig. 25B). En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que el tratamiento con mAb anti-TWEAK mejora la reestenosis después de la angioplastia.

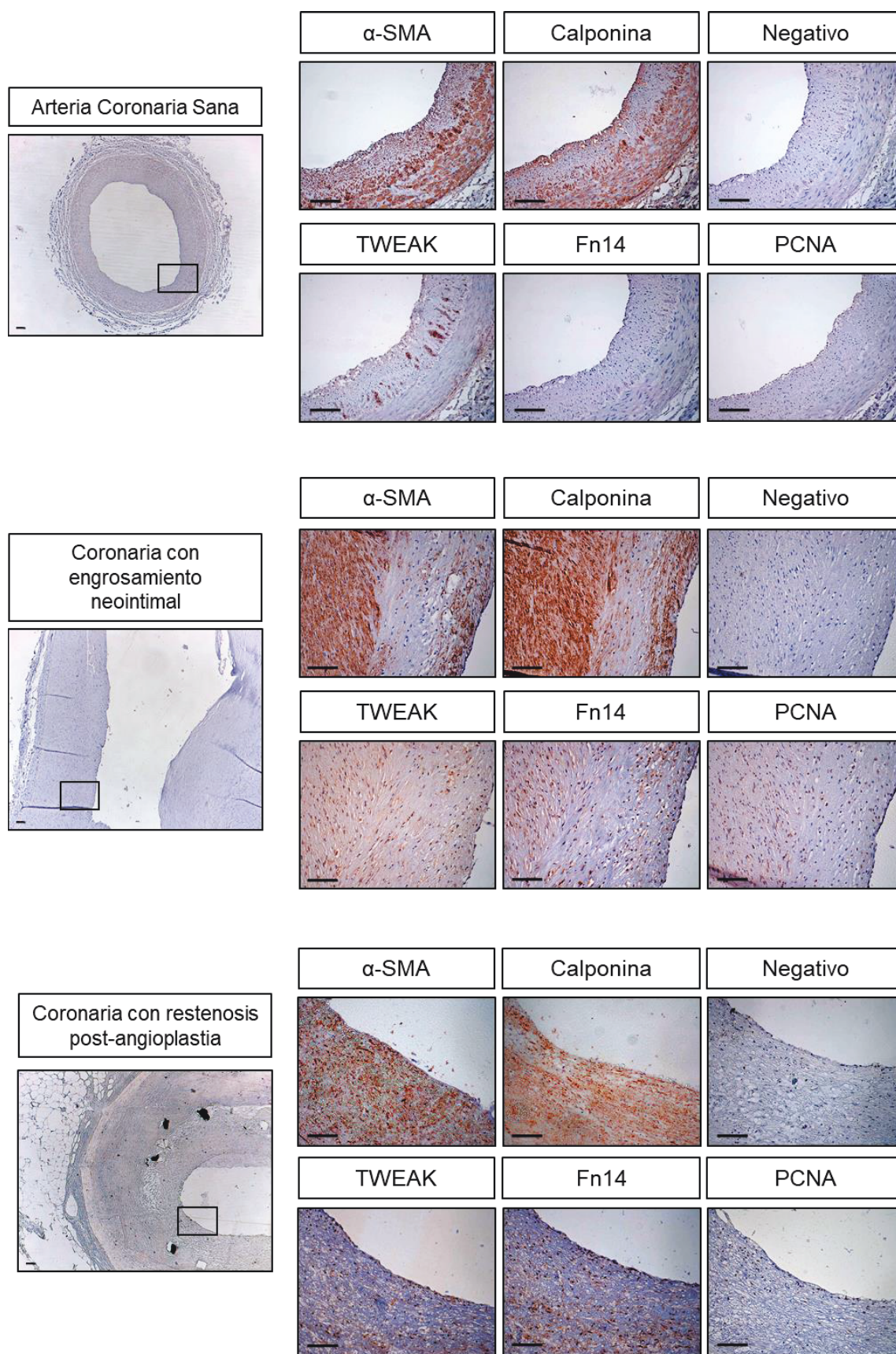




**Figura 25: El tratamiento con anti-TWEAK inhibe la formación de neointima después de una lesión con guía de angioplastia en la arteria femoral de ratones salvajes. A)** Imágenes representativas y cuantificación de células PCNA positivas en secciones transversales de arterias femorales lesionadas de ratones tratados con IgG (N = 10) y anti-TWEAK (N = 11). Los datos representan la media  $\pm$  SEM (ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni) \*\*\*  $p < .001$  vs WT. Barras de escala de 50  $\mu$ m. **B)** Imágenes representativas de la tinción anti-ciclina D1, CDK6, CDK4 y p15<sup>INK4B</sup> de secciones transversales de arterias femorales lesionadas de ratones tratados con IgG y anti-TWEAK. Cuantificación del porcentaje íntima y media de la ciclina D1, CDK6, CDK4 y p15<sup>INK4B</sup>, respectivamente, en la arteria femoral lesionada de IgG (N = 10), anti-TWEAK (N = 11). Los datos representan la media  $\pm$  SEM (prueba U de Mann-Whitney) \*\*  $p < .01$  vs IgG.

### 1.6 Eje TWEAK/Fn14 en el engrosamiento neointimal humano.

Finalmente, para trasladar los resultados obtenidos de nuestro modelo *in vivo* al contexto humano, realizamos inmunohistoquímicas de  $\alpha$ -SMA, calponina, Fn14, TWEAK y PCNA en arterias coronarias humanas estenóticas y sanas. Se observó que TWEAK se expresaba en arterias coronarias sanas mientras que la expresión de Fn14 estaba ausente. Además, observamos que TWEAK y Fn14 se expresan en arterias coronarias humanas con estenosis (Fig. 26), así como en arterias con reestenosis post-angioplastia (Fig. 26), además colocalizando con marcadores de CMLV como  $\alpha$ -SMA y calponina. Las células positivas para PCNA también están presentes en la neointima de ambos tipos de arterias coronarias lesionadas en humanos, pero no en arterias sanas (Fig. 26).

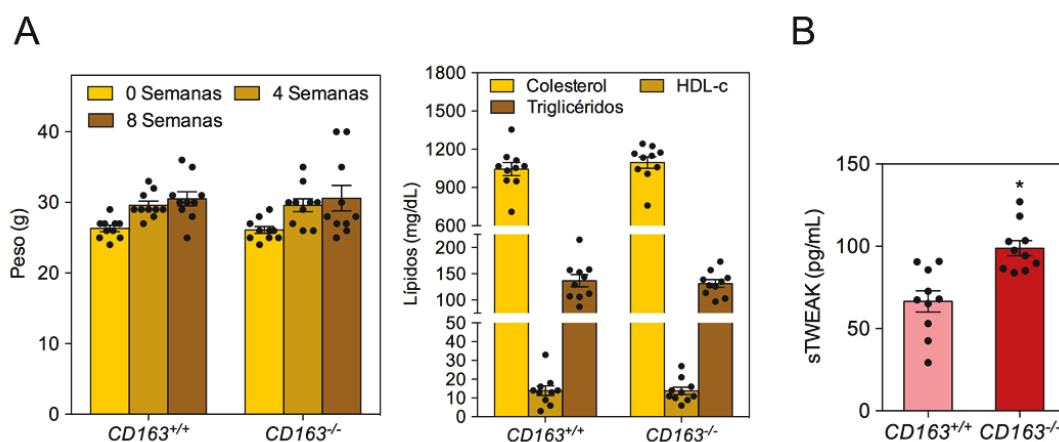


**Figura 26: TWEAK y Fn14 están altamente expresados en la neointima de las arterias coronarias humanas.** Imágenes representativas de inmunotinción para marcadores de CMLV ( $\alpha$ -SMA y calponina), TWEAK, Fn14 o PCNA en secciones en serie de arteria coronaria humana con o sin estenosis. Los controles negativos se tiñeron con IgG no específica. Barras de escala de 100  $\mu$ m.

## 2. El papel de CD163 en la progresión de la lesión aterosclerótica.

### 2.1. CD163 favorece la resolución de la placa aterosclerótica.

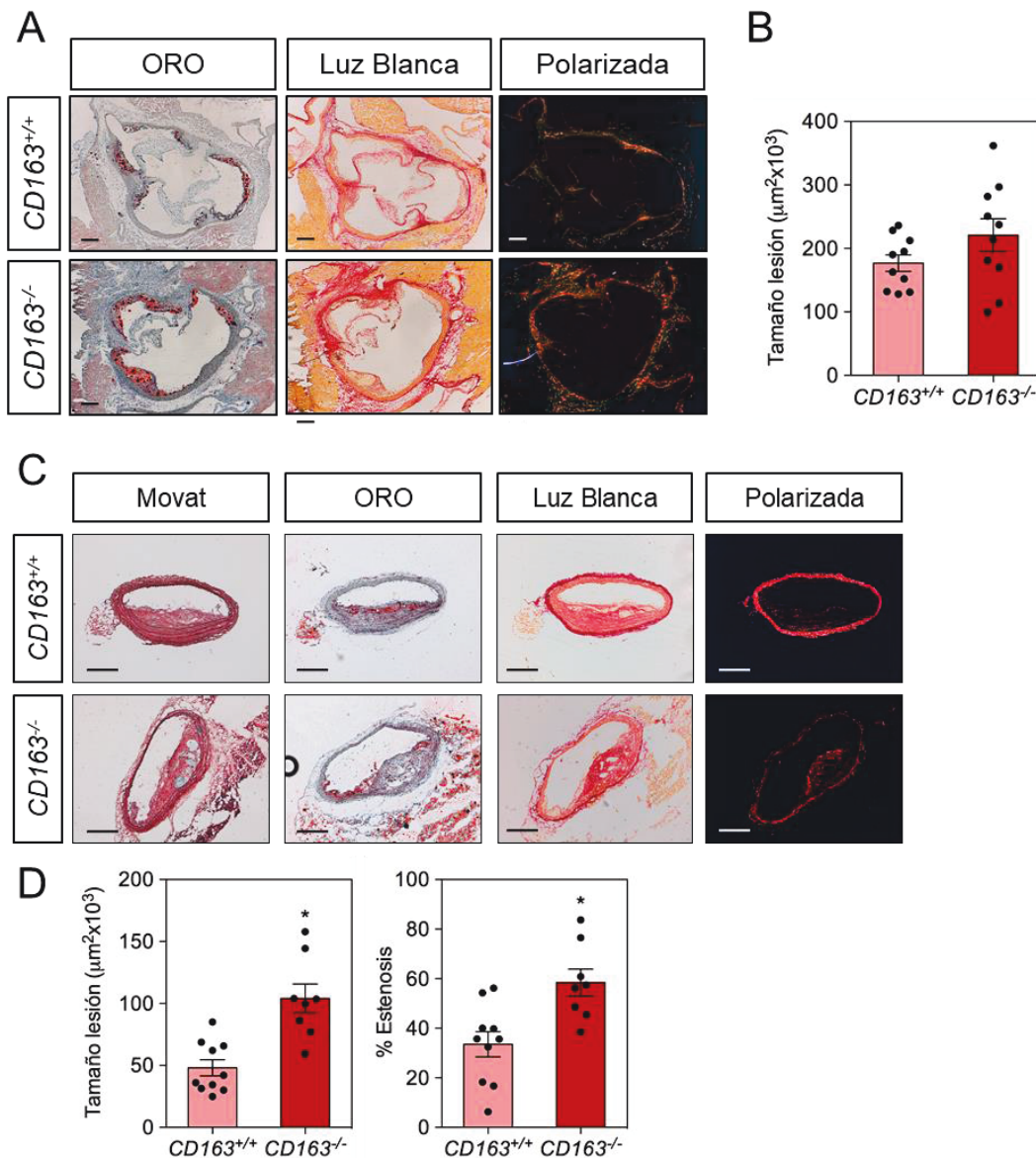
El papel principal de CD163 es limitar la toxicidad de la Hb dentro de las placas ateroscleróticas (Schaer et al., 2006). Por esa razón, decidimos investigar si la delección de CD163 *in vivo* alteraría la aterogénesis y la composición de la placa. Para ello, se generaron ratones doble deficientes en *ApoE* y *CD163* (*ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>) cruzando ratones *CD163*<sup>-/-</sup> (generosamente proporcionados por Søren K. Moestrup, Odense, Dinamarca) con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> que desarrollan de forma espontánea placas de aterosclerosis. La aparición y crecimiento de estas placas se puede acelerar mediante la alimentación de estos animales con dieta rica en colesterol y grasas (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Con este fin, ratones de 12 semanas de edad que carecían de *CD163* y *ApoE* (*ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>) y su grupo control (únicamente deficientes en *ApoE*; *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>) se alimentaron con una dieta hiperlipidémica durante 8 semanas. Tanto los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> como los *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> mostraron incrementos de peso similares después de las 8 semanas de dieta, así como concentraciones similares en suero de triglicéridos, colesterol total y HDL (Fig. 27A). Sin embargo, observamos como los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> presentaron un aumento en las concentraciones plasmáticas de sTWEAK en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (Fig. 27B).



**Figura 27: CD163 reduce las concentraciones plasmáticas de sTWEAK. A)** Peso (gr) y concentración de lípidos (mg/dL) de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (N = 10), *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (N = 10). **B)** Concentraciones séricas de sTWEAK en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (n = 10) o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (n = 10) al final del estudio. \* p < 0,001, prueba t de Student.

Analizamos las lesiones en ambos territorios vasculares, tanto en el seno aórtico como en la arteria braquiocefálica (ABC). Los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> mostraron un aumento no significativo del 21% del tamaño de la placa en la raíz aórtica en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (Fig. 28A-B). Sin embargo, en la ABC se observó un incremento significativo del 110% en el tamaño de la placa y del 58% en la estenosis en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>. (Fig. 28C-D).



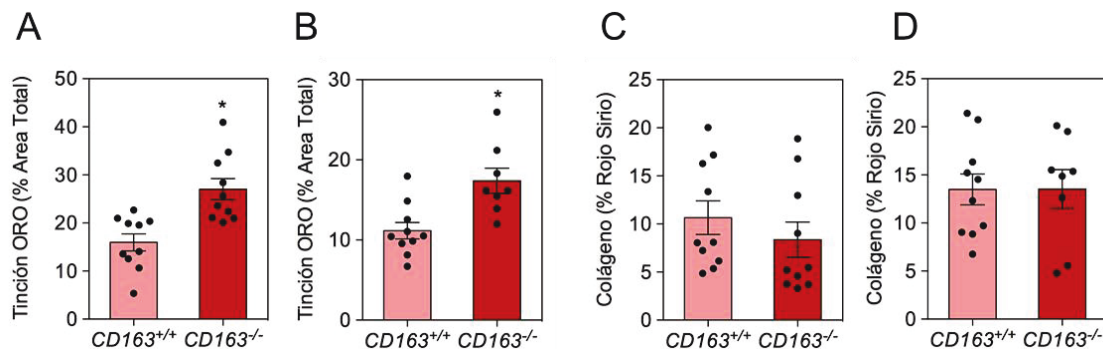


**Figura 28: CD163 reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica en ratones deficientes en *ApoE*.** **A)** Tinción representativa de Oil Red O/Hematoxilina y Sirius Red en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup> a las 8 semanas de dieta. Barras de escala de 200  $\mu\text{m}$ . **B)** Cuantificación del área de la lesión en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. \*  $p < 0,01$ , prueba t de Student. **C)** Fotografías representativas de las secciones de pentacrómico de Movat, tinción de Oil Red O/Hematoxilina y Sirius Red en la arteria braquiocefálica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>. Barras de escala de 200  $\mu\text{m}$ . **D)** Cuantificación del área de la lesión y % de estenosis en las arterias braquiocefálicas de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales por grupo. \*  $p < 0,005$ , prueba t de Student.

Posteriormente, se analizaron otros parámetros representativos de la estabilidad de las placas; mientras que las fibras de colágeno estabilizan las placas ateroscleróticas, los depósitos de lípidos hacen que las placas sean más propensas a la rotura (Rekhter, 2002). Se observó que ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup> presentaban un mayor contenido lipídico de Oil-Red O (ORO) en las placas ateroscleróticas presentes en ambos territorios, raíces aórticas (Fig. 28A, Fig. 29A) y ABC (Fig. 28C, Fig. 29B) en

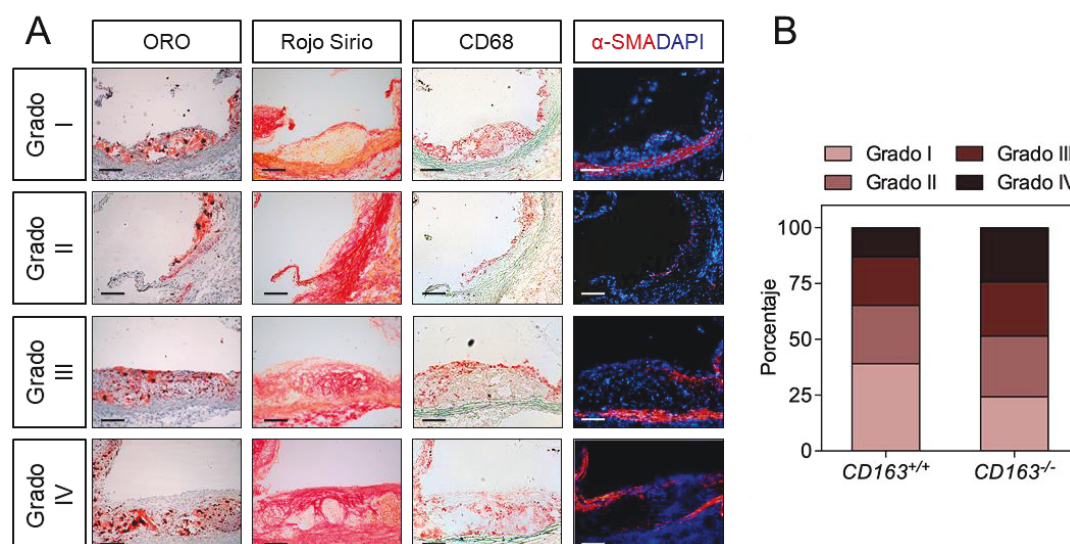


comparación con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>. Por otra parte, al analizar el contenido de colágeno de ambos territorios vasculares observamos un contenido similar en las lesiones ateroscleróticas presentes en la raíz aórtica (Fig. 28A, Fig. 29C) o ABC (Fig. 28C, Fig. 29D) de ambos genotipos.



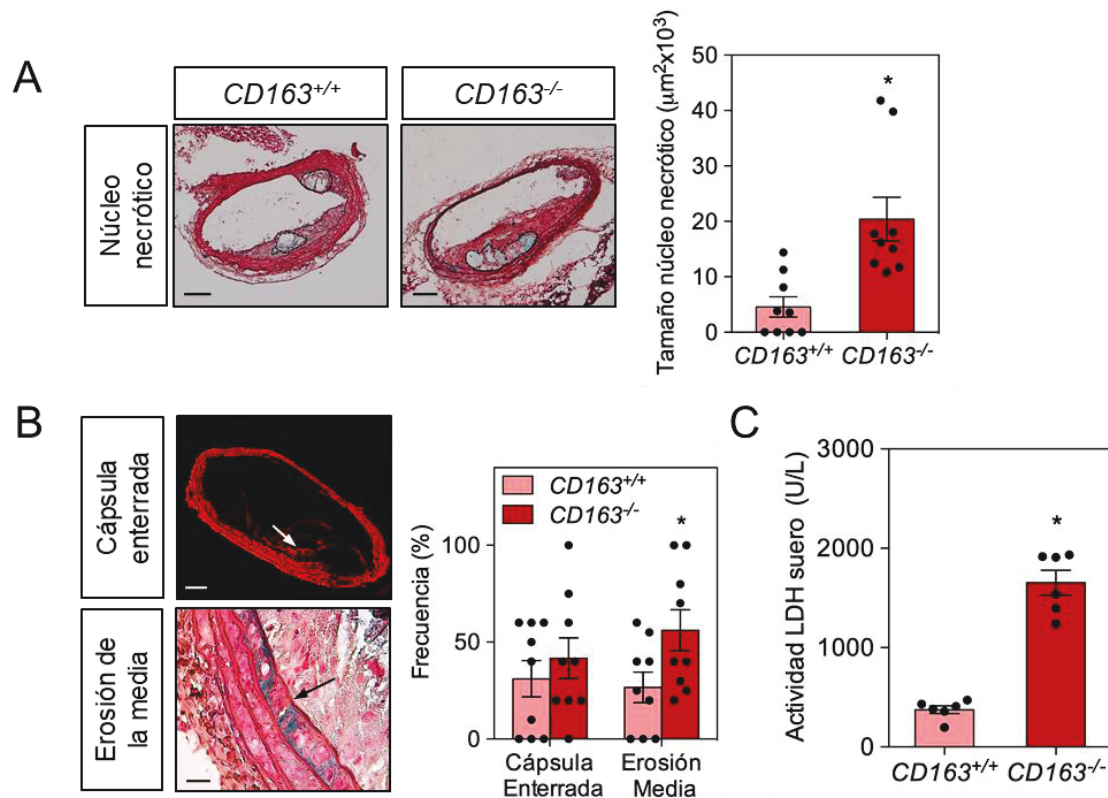
**Figura 29: La ausencia de CD163 aumenta el contenido lipídico sin variar el contenido de colágeno de las placas ateroscleróticas. A)** Tinción Oil Red O en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. \*  $p < 0,01$ , prueba t de Student. **B)** Tinción Oil Red O en las arterias braquiocefálicas de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales por grupo. \*  $p < 0,005$ , prueba t de Student. **C)** Tinción con Sirius Red en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. \*  $p < 0,01$ , prueba t de Student. **D)** Tinción con Sirius Red en las arterias braquiocefálicas de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales por grupo. \*  $p < 0,005$ , prueba t de Student.

La composición de la placa es otro de los parámetros relevantes relacionados con el grado de desarrollo de la lesión aterosclerótica, en el que influye el porcentaje de macrófagos, CMLV y el patrón de deposición lipídica. En este caso, para analizar el efecto de la deficiencia de *CD163* en la composición de las placas ateroscleróticas en ratones, utilizamos el método de Stary (Fig. 30A) (Stary et al., 1994), por el cual se dividen las placas en diferentes grados de progresión: grado I, placas tempranas compuestas únicamente por macrófagos; grado II, lesiones intermedias que contienen macrófagos, CMLV y algunos cristales de colesterol dispersos; grado III, lesiones que contienen macrófagos, CMLV y numerosas acúmulos de cristales de colesterol; y grado IV, placas avanzadas que contienen macrófagos, CMLV y un núcleo necrótico. Aproximadamente el 40% de las placas en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> fueron lesiones tempranas (grado I), mientras que sólo el 13% de las placas fueron placas avanzadas (grado IV) con presencia de núcleo necrótico (Fig. 30B). En cambio, los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> presentaron un porcentaje de placas avanzadas del 25% mientras que 23% de placas fueron lesiones tempranas (Fig. 30B). Estos valores podrían indicar que la deficiencia de *CD163* está asociada a una aceleración en el desarrollo y progresión de la placa de aterosclerosis.



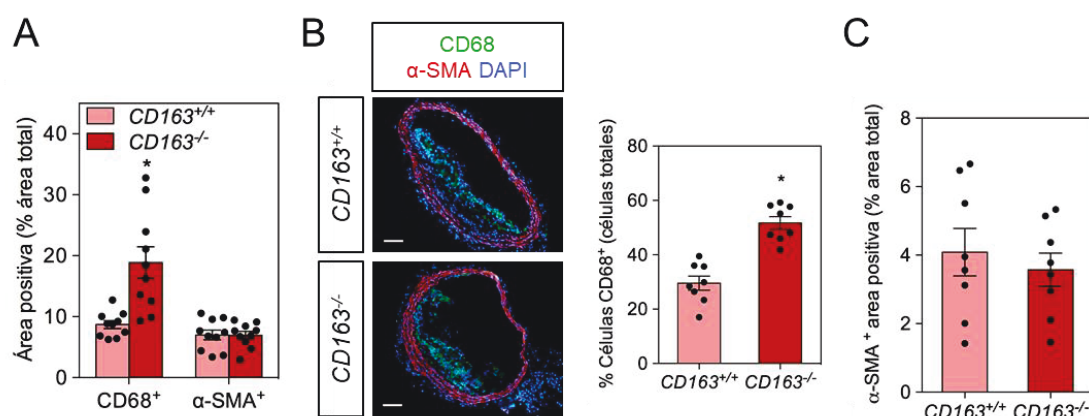
**Figura 30: CD163 reduce la progresión de las placas ateroscleróticas. A)** Fotografías representativas de secciones teñidas con Oil-Red-O, Sirius red, α-SMA + DAPI y CD68 clasificadas según el método Stary (grado I a IV). Barra de escala de 100 μm. **B)** Porcentaje de cada grado del método Stary entre los diferentes grupos de animales analizados. N = 25 placas por grupo.

A continuación, analizamos la región de la ABC para otras características que se asocian y contribuyen a disminuir la estabilidad de la placa, como es el tamaño del núcleo necrótico, y la presencia de erosión de la media y de cápsulas enterradas (Rosenfeld et al., 2000). Estas características son más evidentes en la ABC que en la raíz aórtica. Se observó un aumento en el tamaño de los núcleos necróticos en los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (Fig. 31A) y una mayor frecuencia de erosión de la media (Fig. 31B) en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>. No se observaron diferencias en la frecuencia de cápsulas enterradas entre ambos genotipos (Fig. 31B). Además, se midió la actividad LDH en los sueros de los ratones para analizar el daño tisular. Los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> presentaron un aumento en la actividad LDH en suero en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (Fig. 31C) lo que indicaría que la deficiencia en CD163 estaría dando lugar a un mayor daño tisular que el observado en ratones deficientes únicamente en *ApoE*.



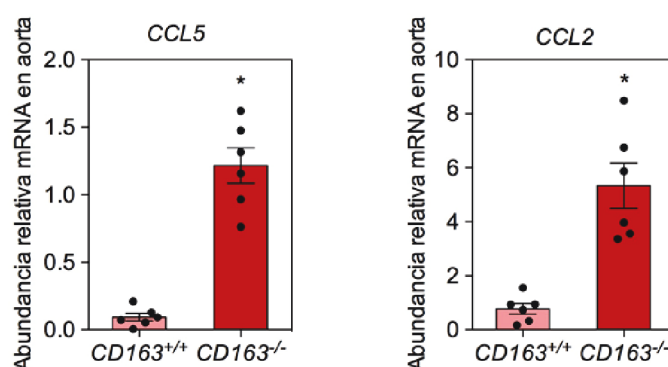
**Figura 31: CD163 disminuye características de inestabilidad de la placa aterosclerótica y de daño tisular en ratones deficientes para *ApoE*.** **A)** Imágenes representativas de secciones transversales de ABC de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>-/-</sup> teñidas con Movat. Las líneas discontinuas muestran el límite del área necrótica en desarrollo (NC). La cuantificación del área del núcleo necrótico se muestra en el panel derecho. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 9 animales por grupo; \*  $p < 0,005$ , prueba t de Student. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Imágenes representativas de secciones transversales de ABC que muestran la presencia de cápsulas enterradas (tinción  $\alpha$ -SMA) y erosión de la media (tinción movat) en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>-/-</sup>. Frecuencia de marcadores morfológicos de inestabilidad de la placa en el panel inferior. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 9 animales por grupo; \*  $p < 0,05$ , prueba t de Student. Barra de escala de 100  $\mu\text{m}$  (25  $\mu\text{m}$  para erosión de la media). **C)** Actividad de LDH en suero de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>-/-</sup>. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo; \*  $p < 0,001$ , prueba t de Student.

La inflamación tiene un gran impacto en la vulnerabilidad de las placas ateroscleróticas (Stoll & Bendszus, 2006) por lo que nuestro siguiente objetivo fue analizar el perfil inflamatorio de las placas ateroscleróticas en ambos tipos de ratones. Las lesiones ateroscleróticas de ratones deficientes en *CD163* mostraron un aumento del área positiva para el marcador de macrófagos CD68 del 96% en el seno aórtico (Fig. 32A), y del 74% en la ABC (Fig. 32B) comparado con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>/*CD163*<sup>+/+</sup>. No se observaron cambios en los niveles de actina de músculo liso como indicó la tinción específica de  $\alpha$ -SMA (Fig. 32A, C).



**Figura 32: CD163 modula el contenido inflamatorio en placas ateroscleróticas de ratones deficientes para ApoE.** **A)** Cuantificación de CD68 y α-SMA en la zona de raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los valores mostrados son la media ± SEM de 10 animales por grupo. \* *p* < 0,005, prueba *t* de Student. **B)** Imágenes representativas de secciones transversales de ABC teñidas con α-SMA o CD68 de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>, y cuantificación de las células positivas para CD68. Los datos representan la media ± SEM de 8 animales por grupo; \* *p* < 0,001, prueba *t* de Student. Barra de escala de 100 μm. **C)** Cuantificación del área positiva para α-SMA en placas ateroscleróticas de ABC de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los datos representan la media ± SEM de 8 animales por grupo.

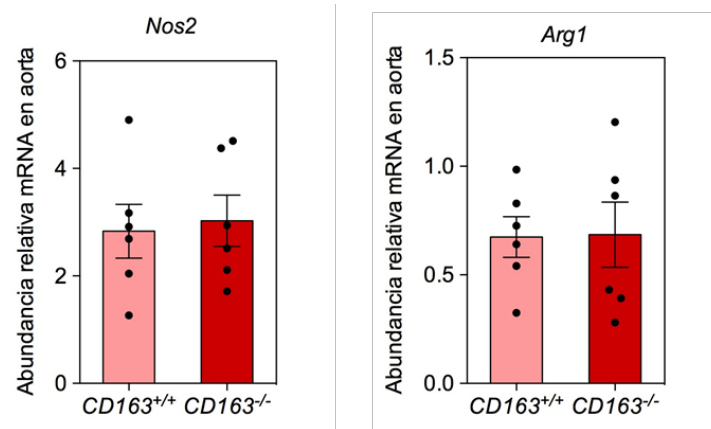
El infiltrado de monocitos en las lesiones ateroscleróticas ocurre principalmente en respuesta a citoquinas proinflamatorias como CCL2 y CCL5. En este sentido observamos que los ratones con deficiencia en *CD163* presentaban una mayor expresión del ARNm de *Ccl2* y *Ccl5* en extractos de aorta completa en comparación con sus ratones control (Fig. 33), lo que indica que la presencia de *CD163* modula el microambiente proinflamatorio de la lesión.



**Figura 33: CD163 modula la infiltración de monocitos en las placas ateroscleróticas de ratones deficientes en ApoE.** Niveles de expresión de ARNm de *Ccl2* y *Ccl5* relativos normalizados a ARNr 18S de aortas de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup>. Los datos representan la media ± SEM de 6 animales por grupo; \* *p* < 0,001, prueba *t* de Student.

En este sentido se ha descrito que en las lesiones ateroscleróticas se pueden encontrar macrófagos tanto pro-inflamatorios (M1) como antiinflamatorios (M2), con fenotipos extremadamente polarizados (Leitinger & Schulman, 2013). Dado que *CD163* se considera un marcador de macrófagos de tipo M2, decidimos comprobar si la deficiencia de *CD163* puede influir en

la polarización de los macrófagos. Mediante análisis de la expresión génica de marcadores de macrófagos M1 (*Nos2*) o macrófagos M2 (*Arg1*) se pudo observar que no había cambios en la polarización de macrófagos presentes en la aorta de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (Fig. 34).



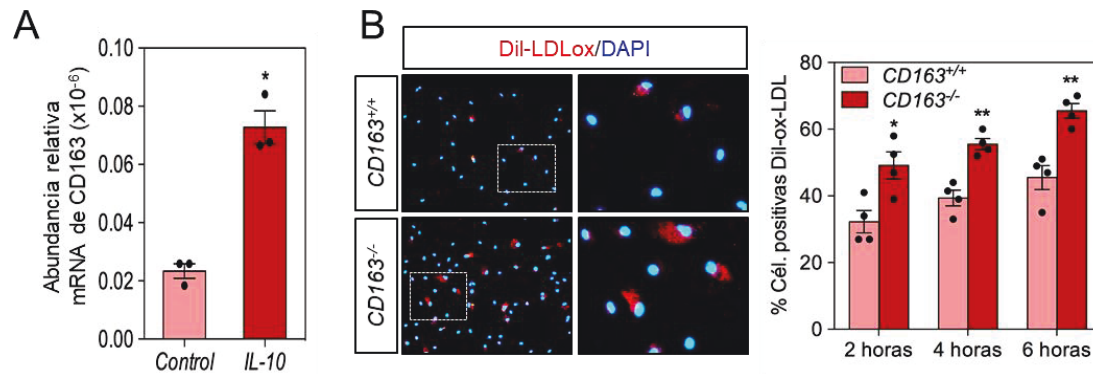
**Figura 34: Ausencia de polarización de los macrófagos M1 y M2 en las placas de los ratones deficientes en *ApoE*.** Expresión de ARNm de *Nos2* (marcador M1) y *Arg1* (marcador M2) en aortas de *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (N = 6) y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> (N = 6). Los datos se presentan como media ± SEM de 6 animales por grupo.

En conjunto, estos resultados demuestran que la deficiencia de *CD163* favorece la progresión de la placa de aterosclerosis en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> hiperlipidémicos regulando el ambiente proinflamatorio y la infiltración de macrófagos sin influir en la polarización de estos.

## 2.2. La deficiencia de *CD163* aumenta la formación de células espumosas mediante la regulación positiva de *CD36*.

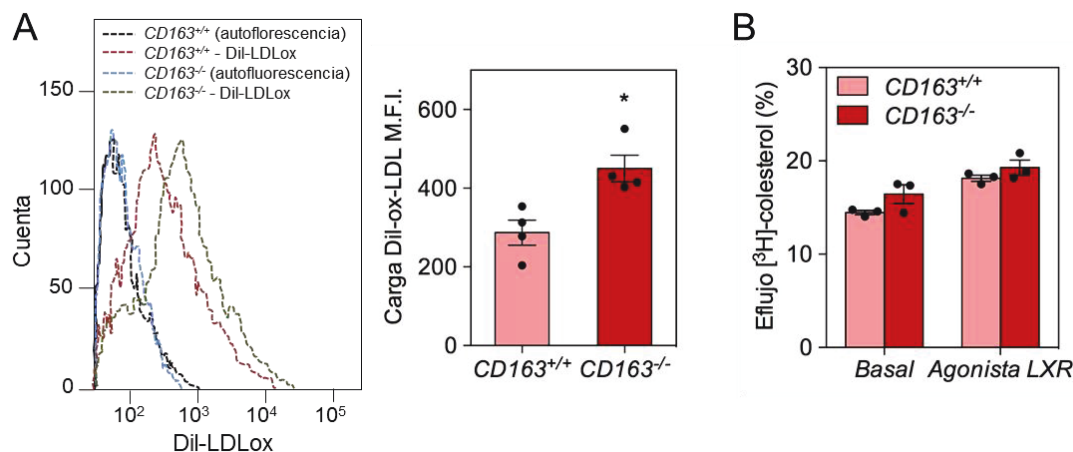
Un paso importante en el desarrollo de la placa aterosclerótica es la formación de células espumosas, resultado de la captación de lípidos por parte de los macrófagos (Glass & Witztum, 2001b). Dado que hemos observado que los ratones deficientes en *CD163* mostraban placas de ateroma con mayor número de macrófagos y con un mayor contenido lipídico, analizamos el papel de *CD163* en la regulación de la captación de lípidos y en el flujo de salida de colesterol. Con este fin, se incubaron macrófagos peritoneales de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> con IL-10 (4 ng/ml; 48 horas), interleucina que aumenta la expresión de *CD163* en macrófagos (Buechler et al., 2000) (Fig. 35A). A continuación, estos mismos macrófagos se incubaron con LDL-ox marcadas con fluorescencia (Dil-LDLox; 10 µg/ml; 2-6 horas) y se analizó el número de macrófagos que incorporaron lípidos. El porcentaje de macrófagos cargados con Dil-LDLox fue mayor en el caso de los macrófagos deficientes en *CD163* que en los controles *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> (Fig. 35B), lo que sugiere que la deficiencia de *CD163* aumenta la formación de células espumosas.





**Figura 35: La ausencia de CD163 promueve la formación de células espumosas. A)** Niveles de expresión de ARNm de *Cd163* relativos y normalizados a ARNr 18S de macrófagos peritoneales de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> tratados con IL-10 (4 ng/ml) durante 48 horas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes; \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student. **B)** Imágenes representativas de macrófagos peritoneales *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> incubados con o sin Dil-LDLox (10 µg/mL) durante 4 horas. Cuantificación de células positivas para Dil-LDLox incubadas con o sin Dil-LDLox durante 2-6 horas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes; \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ ; Prueba t de Student. Barras de escala, 50 µm (bajo aumento); 20 µm (gran aumento).

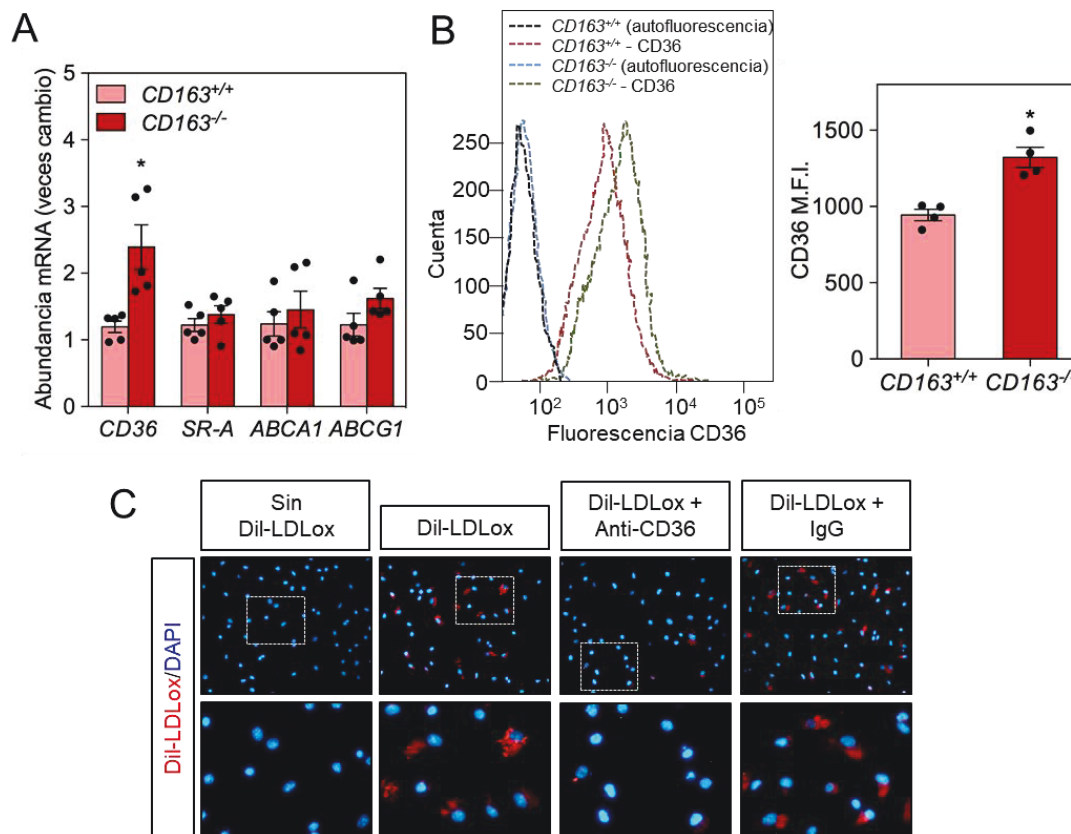
El aumento en la acumulación de lípidos de los macrófagos *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> podría ser bien el resultado de un aumento en la captación de LDL modificadas, o una disminución en el eflujo de salida de colesterol. Para analizar estas posibilidades, realizamos ensayos de captación de LDL incubando macrófagos peritoneales aislados de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> con Dil-LDLox y cuantificamos la captación mediante citometría de flujo. Se observó una mayor captación de Dil-LDLox en macrófagos deficientes en *CD163* que en macrófagos que expresan *CD163* (Fig. 36A). Además, en ensayos de flujo de salida de colesterol a suero empobrecido en ApoB en condiciones basales o estimulados con el agonista T0901217 de LXR no se observaron diferencias entre ambos genotipos de macrófagos (Fig. 36B), lo que indicaría que la ausencia de *CD163* aumenta la captación de LDL en macrófagos sin afectar al eflujo de colesterol.



**Figura 36: La ausencia de CD163 aumenta la captación de LDL modificadas. A)** Análisis de citometría de flujo de la captación de Dil-LDLox en macrófagos peritoneales de *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> incubados con Dil-

LDLox (10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 2 horas. Los resultados se expresan en términos de intensidad de fluorescencia media geométrica (M.F.I) después de restar la autofluorescencia de las células incubadas en ausencia de Dil-LDLox. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student. **B)** Eflujo de colesterol a plasma empobrecido en ApoB en macrófagos peritoneales de *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* o *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* estimulado con o sin agonista LXR. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de muestras duplicadas ( $n = 3$  por grupo).

A continuación, analizamos en los macrófagos peritoneales la expresión de los receptores captadores, SR-A y CD36, y de los transportadores de casete de unión a ATP, ABCG1 y ABCA1, todos ellos principales transportadores responsables del eflujo de colesterol en los macrófagos. Observamos un aumento en la expresión de ARNm y proteína de CD36 en los macrófagos *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* en comparación con los macrófagos *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* (Fig. 37A-B), mientras que la expresión de ARNm de *SR-A*, *Abcg1* y *Abca1* fue similar entre ambos tipos de macrófagos (Fig. 3A). Con el objetivo de verificar si las diferencias en la captación de LDLox que observamos entre genotipos son debidas a estas diferencias en la expresión de CD36 utilizamos un anticuerpo bloqueante anti-CD36. Macrófagos peritoneales *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* preincubados con anti-CD36 una hora antes de la estimulación con Dil-LDLox mostraron una clara disminución en la formación de células espumosas (Fig. 3C). En conjunto, estos resultados demuestran que la pérdida de CD163 aumenta la expresión de CD36 y por tanto la captación de LDLox, promoviendo la formación de células espumosas.



**Figura 37: La ausencia de CD163 aumenta la expresión de CD36. A)** Niveles de expresión de ARNm de *Cd36*, *SR-A*, *Abca1* y *Abcg1* relativos y normalizados a ARNr 18S de macrófagos peritoneales de ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>*

tratados con IL-10 (4 ng/mL) durante 48 horas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes; \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student. **B)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD36 en macrófagos peritoneales de *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* o *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* incubados con IL-10 (4 ng/mL) durante 48 horas. Los resultados se expresan en términos de intensidad de fluorescencia media geométrica (M.F.I) después de restar la autofluorescencia de las células incubadas en ausencia del anticuerpo CD36. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ ; Prueba t de Student. **C)** Imágenes representativas de macrófagos peritoneales *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* incubados con o sin Dil-LDLox (10  $\mu$ g/mL) durante 4 horas. Se preincubaron las células con anti-CD36 una hora antes del tratamiento con Dil-LDLox. Se utilizó IgG como control.

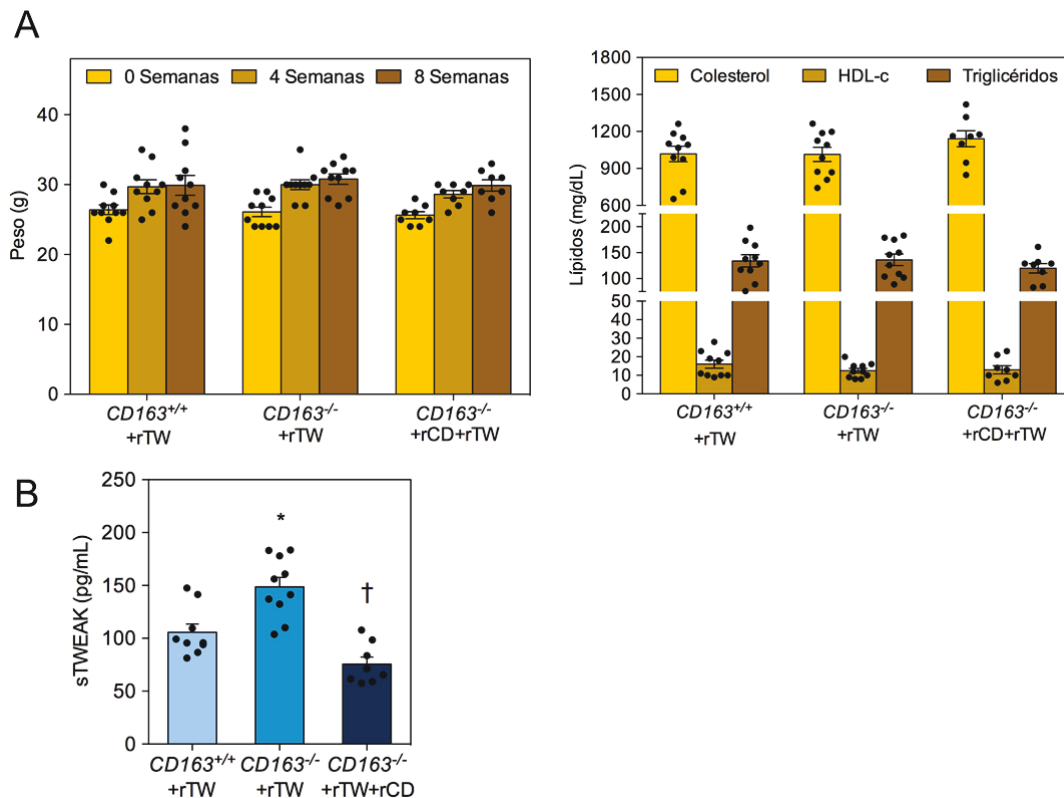
### 2.3. TWEAK agrava la progresión de la aterosclerosis en ratones deficientes en CD163.

Ya que estudios *in vitro* han demostrado previamente que CD163 puede ser un receptor eliminador o basurero (*scavenger*) de TWEAK (Moreno et al., 2009), analizamos el papel de CD163 en la formación y desarrollo de aterosclerosis inducida por TWEAK (Muñoz-García et al., 2009). Para ello realizamos dos enfoques experimentales distintos:

- a) En el primer enfoque administramos TWEAK murino recombinante (rTW; 5  $\mu$ g/kg) tres veces por semana durante 4 semanas en ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* o *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta hiperlipidémica (8 semanas), con el objetivo de ver si la deficiencia de CD163 supone una mayor biodisponibilidad de TWEAK y por tanto mayores efectos proaterogénicos.
- b) Y en un segundo enfoque, analizamos si el tratamiento con CD163 soluble sistémico puede abolir los efectos proaterogénicos de TWEAK inyectando a un tercer grupo de ratones CD163 soluble murino recombinante (rCD; 50  $\mu$ g/kg) tres veces por semana, dos horas antes de la administración de rTW y durante 4 semanas en ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* alimentados con dieta hiperlipidémica (8 semanas).

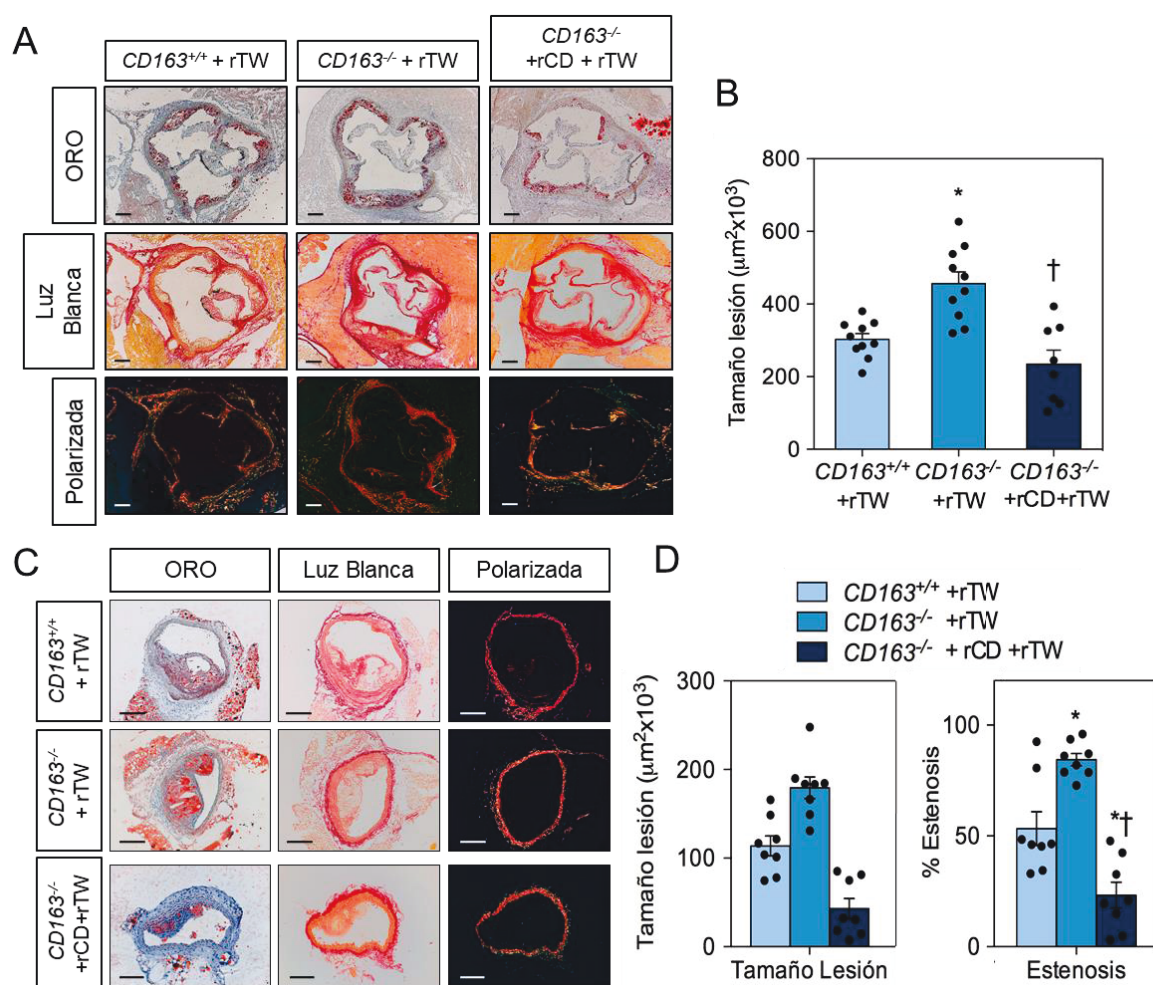
A tiempo final no se observaron diferencias en el peso corporal o las concentraciones de lípidos entre los diferentes grupos de animales (Fig. 38A). Sin embargo, los sueros de ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* presentaron concentraciones plasmáticas de sTWEAK más altas que los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* después del tratamiento con rTW (Fig. 38B), que se vieron disminuidas por la administración sistémica de rCD (Fig. 38B).





**Figura 38: TWEAK aumenta las concentraciones plasmáticas de sTWEAK en ausencia de CD163. A)** Peso (gr) y concentración de lípidos (mg/dL) de ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* más rTW (N = 10), *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* más rTW (N = 10) y *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* más rCD + rTW (N = 8). **B)** Concentraciones séricas de sTWEAK en ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* (n = 10) o *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* (n = 10) tratados con TWEAK recombinante (rTWEAK; 5 µg /kg/tres veces por semana) y *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* (N = 8) tratados con CD163 recombinante (rCD; 50 µg/kg/tres veces por semana) dos horas antes de la administración de rTW. \* p <0,01 frente a *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* + rTW; † p <0,001 frente a *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni.

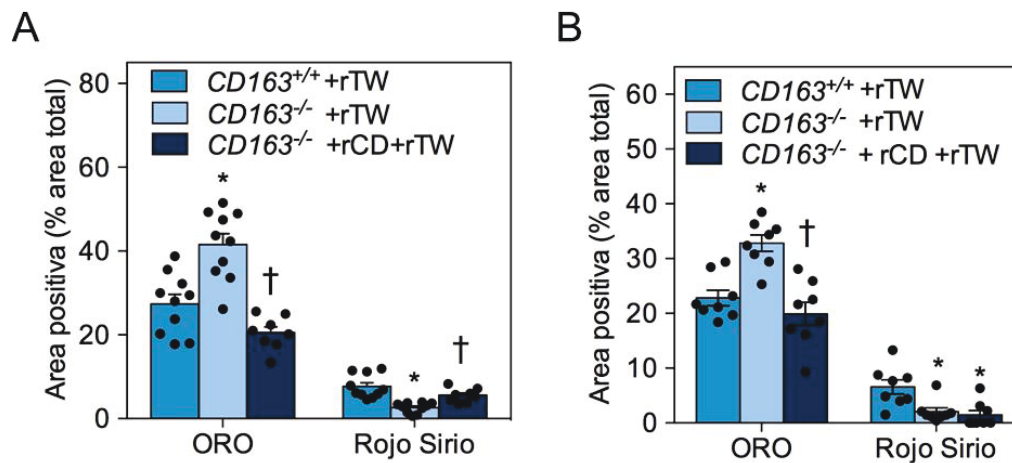
A continuación, analizamos las lesiones producidas tanto en la raíz aórtica como en la ABC y observamos como los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* tratados con rTW mostraron un aumento significativo del 51% en el tamaño de la placa en la raíz aórtica (Fig. 39A-B) y del 62% en las ABC (Fig. E-F) en comparación a los ratones control. Asimismo, se observó un aumento en la estenosis (58%) en las ABC (Fig. 39C-D) en comparación con los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/+</sup>* tratados con rTW. En ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>*, la administración sistémica de rCD disminuyó al 50% y 76% el tamaño de la placa en la raíz aórtica y ABC, respectivamente, comparado con ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* tratados únicamente con rTW (Fig. 39A-B, C-D).



**Figura 39: TWEAK favorece el desarrollo de lesión aterosclerótica en ratones deficientes en *CD163*, que disminuye por la administración sistémica de rCD. A)** Tinción representativa de Oil Red O/Hematoxilina y Sirius Red en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> con los diferentes tratamientos tras 8 semanas de dieta. Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$ . **B)** Cuantificación del área de la lesión en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW y rCD. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales por grupo. \*  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> + rTW. †  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. **C)** Fotografías representativas de secciones de pentacrómico de Movat, tinción de Oil Red O/Hematoxilina y Sirius Red en la ABC de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW sólo o rTW y rCD. Barras de escala, 200  $\mu\text{m}$ . **D)** Cuantificación del área de lesión y % de estenosis en las ABC de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW y rCD. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo. \*  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>; †  $p < 0,001$  vs *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> + rTW, ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni.

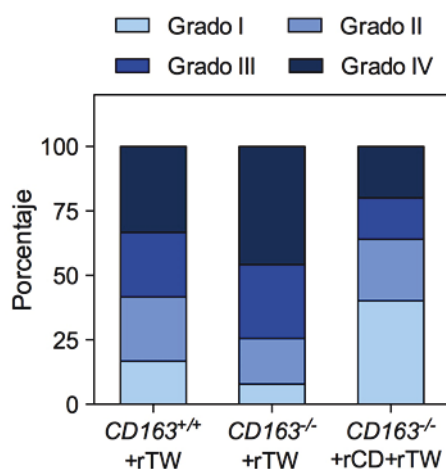
Al analizar el contenido en lípidos y colágeno en las placas ateroscleróticas observamos como los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW mostraron un aumento de contenido lipídico medido por ORO y una reducción en el contenido de colágeno en las placas ateroscleróticas presentes tanto en la raíz aórtica (Fig. 39A, Fig. 40A) como en la ABC (Fig. 39C-Fig. 40B) comparados con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> control. Sin embargo, el tratamiento de estos ratones con rCD previo a la administración de rTW disminuyó significativamente el contenido de lípidos en ambos territorios vasculares, así como la

estabilización en el contenido de colágeno en la raíz aórtica comparado con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados únicamente con rTW (Fig. 40A, B).



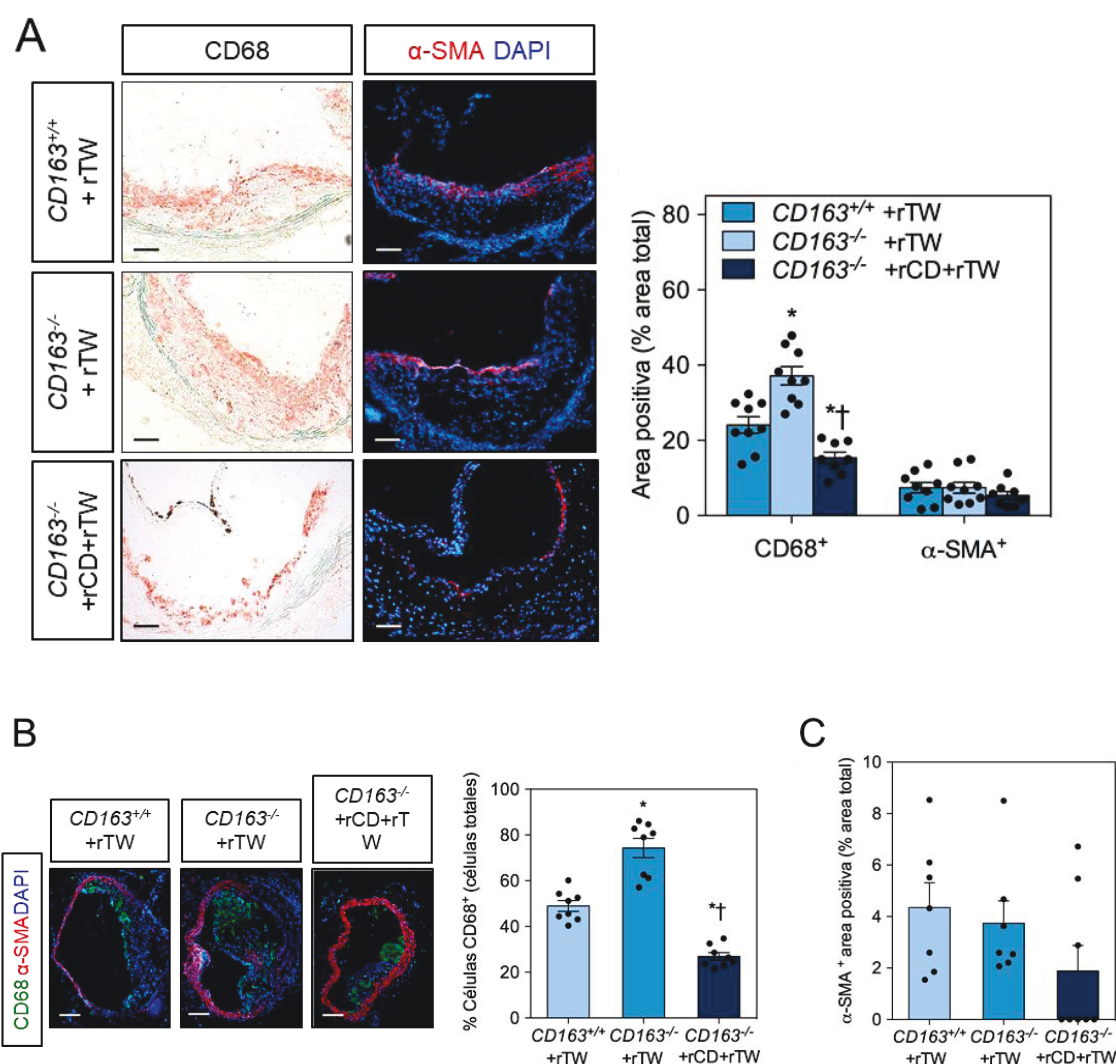
**Figura 40: TWEAK aumenta el contenido en lípidos y disminuye el de colágeno en las lesiones ateroscleróticas en ausencia de *CD163*.** **A)** Tinción Oil Red O y Sirius Red en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW sólo o rTW y rCD. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales por grupo. \*  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> + rTW. †  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. **B)** Tinción de Oil Red O y Sirius Red en la ABC de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW sólo o rTW y rCD. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo. \*  $p < 0,01$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni.

Al analizar la progresión de la placa mediante el método de Stary se observó que aproximadamente el 17% de placas en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> tratados con rTW eran lesiones tempranas (grado I) mientras que el 33% eran placas avanzadas (grado IV). Por el contrario, ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW presentaban un alto porcentaje de lesiones en estadio avanzado (46%) y sólo un 8% de lesiones tempranas (Fig. 41). Sin embargo, se observó que los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> inyectados con rCD y rTW, presentaban casi la mitad de las placas (40%) en estadio temprano (grado I) con solo un 20% de ellas que progresaba a estadio avanzado (grado IV) (Fig. 41).



**Figura 41: TWEAK aumenta la progresión de la placa en ratones deficientes en *CD163*.** Porcentaje de cada grado del método Stary entre diferentes grupos. N = 20-25 placas por grupo.

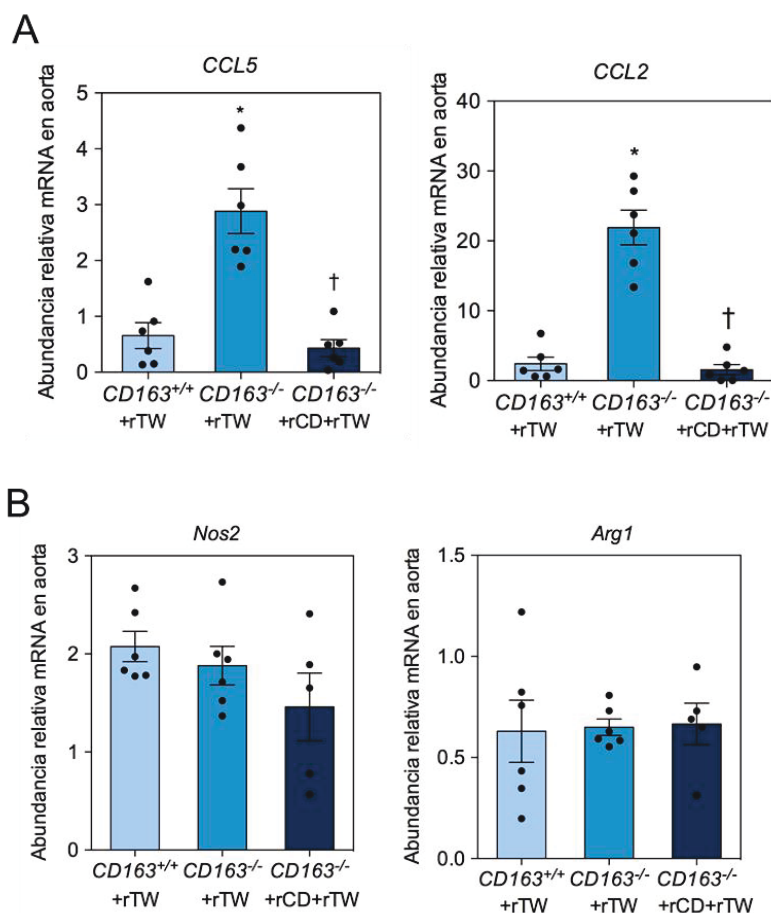
Posteriormente, analizamos el contenido inflamatorio en las lesiones ateroscleróticas y observamos como los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW mostraron un aumento del 54% en el contenido de macrófagos (células CD68+) en la raíz aórtica (Fig. 42A) y del 51% en la ABC (Fig. 42B) en comparación con ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>. El tratamiento con rCD revirtió el efecto proinflamatorio de rTW observándose una reducción del 58% en el contenido de macrófagos en la raíz aórtica (Fig. 42A) y del 64% en la ABC (Fig. 42B). Cabe destacar que no se observaron cambios en el número de células de músculo liso vascular medido por los niveles de  $\alpha$ -SMA+ en las lesiones entre los distintos grupos de ratones (Fig. 42A-C).



**Figura 42: La biodisponibilidad de TWEAK regula el contenido inflamatorio en placas de ateroscleróticas. A)** Fotografías representativas de secciones teñidas con  $\alpha$ -SMA + DAPI y CD68. Cuantificación de CD68 y  $\alpha$ -SMA en la raíz aórtica de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW más rCD en el panel derecho. Los valores mostrados son la media  $\pm$  SEM de 8-9 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup>; †  $p < 0,001$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. Barra de escala, 100  $\mu$ m. **B)** Imágenes representativas de secciones transversales de ABC teñidas con  $\alpha$ -SMA o CD68 de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW sólo o rTW más rCD. La cuantificación de las células positivas para CD68 se muestra en el panel derecho. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo; \*  $p < 0,05$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>+/+</sup> + rTW; †  $p < 0,001$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup>*CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. Barra de escala, 100  $\mu$ m. **C)** Cuantificación del área positiva de  $\alpha$ -SMA en

placas ateroscleróticas de la ABC de ratones  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  + rTW,  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  + rTW o  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  + rTW + rCD. Datos representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo.

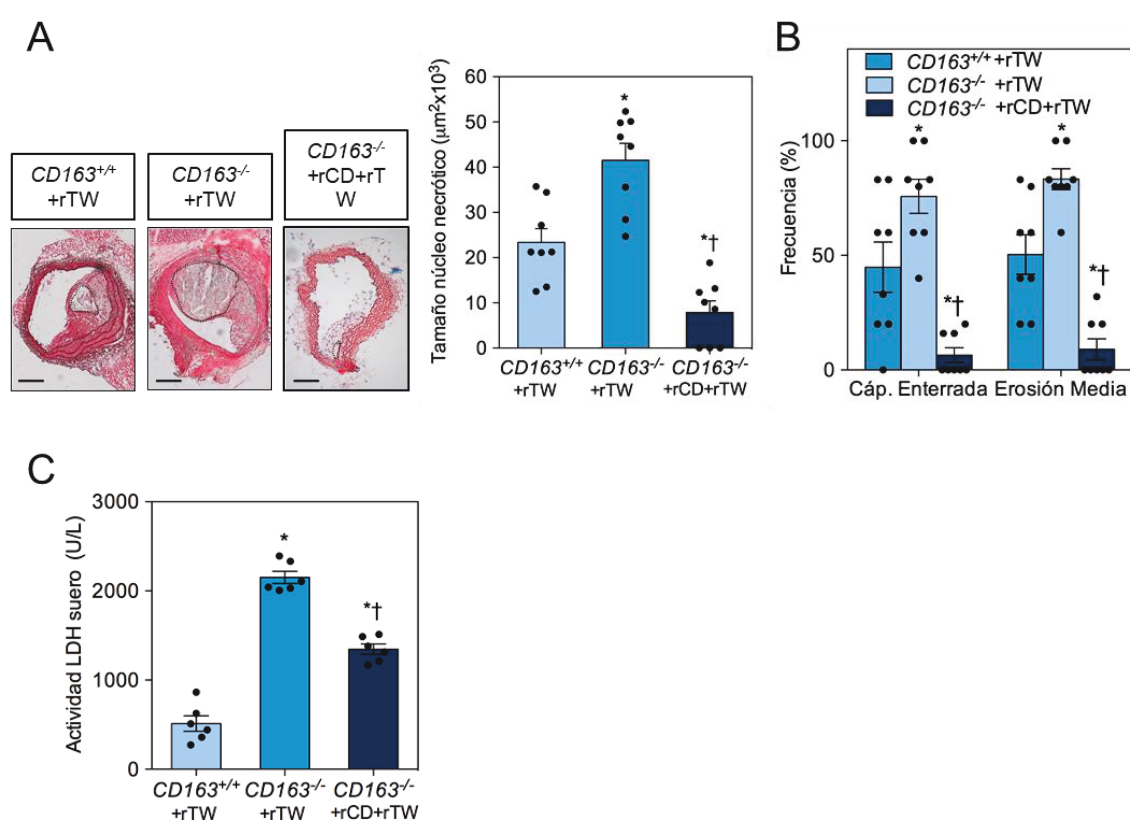
A continuación, se midieron los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias en las aortas de los diferentes grupos de ratones. Observamos como las aortas de ratones deficientes en *CD163* mostraron un aumento de la expresión de ARNm de las citoquinas *Ccl2* y *Ccl5* tras el tratamiento con rTW que fue revertido a niveles de los ratones controles  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  tras el tratamiento con rCD (Fig. 43A). Al igual que ocurrió en el modelo anterior, no se observaron cambios en la expresión de ARNm de los marcadores genéticos *Nos2*-M1 o *Arg1*-M2 en la aorta de ratones  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  o  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  tratados con rTW ni con rCD (Fig. 43B). Esto indica que la deficiencia en *CD163* y el tratamiento con rTW o rCD no está influyendo en la polarización de los macrófagos.



**Figura 43: TWEAK regula el microambiente inflamatorio de las placas ateroscleróticas de forma dependiente de CD163.** **A)** Niveles de expresión de ARNm de *Ccl2* y *Ccl5* relativos normalizados a ARNr 18S de aortas de ratones  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  o  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  tratados con rTW sólo o rTW más rCD. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo; \*  $p < 0,001$  frente a  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  + rTW. †  $p < 0,001$  frente a  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. **B)** Expresión de ARNm de *Nos2* (marcador M1) y *Arg1* (marcador M2) en aortas de  $ApoE^{-/-}CD163^{+/+}$  más rTW (N = 6), o  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  más rTW (N = 6) y o  $ApoE^{-/-}CD163^{-/-}$  más ratones rCD + rTW (N = 5). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de 5-6 animales por grupo.



Como en el modelo anterior, analizamos características asociadas a la disminución de la estabilidad de la placa en las ABC. Observamos que el tratamiento con rTW de los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> promueve el aumento del tamaño de los núcleos necróticos (Fig. 44A) así como la aparición de cápsulas enterradas y de erosión de la media (Fig. 44B) comparado con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup>. El pretratamiento con rCD de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> y rTW demostró que el CD163 sistémico mejoraba las condiciones de estabilidad de la placa con un menor tamaño de núcleos necróticos (Fig. 44A), y una frecuencia de cápsulas enterradas y erosión de la media menores incluso que los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> +rTW (Fig. 44B). Asimismo, los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW presentaron una mayor actividad de LDH en suero en comparación con los ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> que se vio parcialmente disminuida con el tratamiento con rCD en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> + rTW (Fig. 44C).

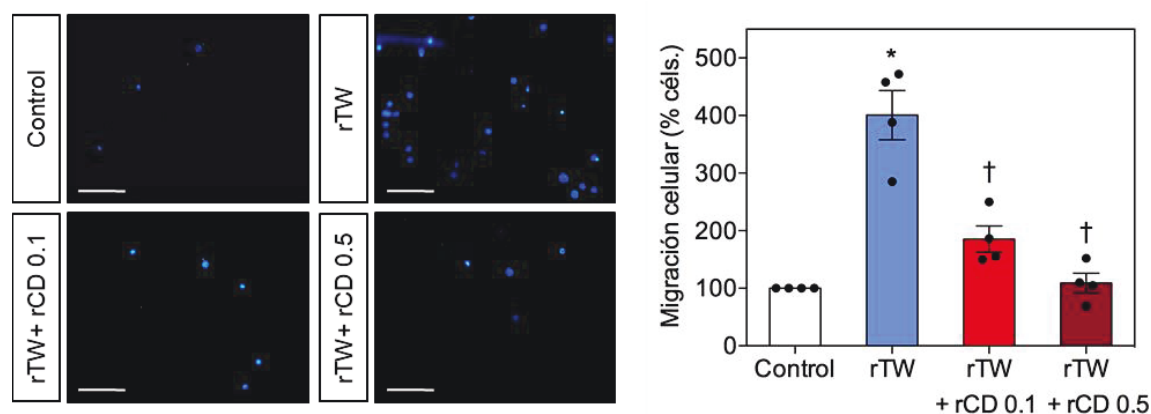


**Figura 44: TWEAK induce la inestabilidad de la placa y el aumento del daño tisular en ratones deficientes en CD163.** **A)** Imágenes representativas de secciones transversales de ABC teñidas con Movat de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW más rCD. Las líneas discontinuas muestran el límite del área necrótica en desarrollo (NC). La cuantificación del área del núcleo necrótico se muestra en el siguiente panel. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo; \*  $p < 0,05$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup>; †  $p < 0,001$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. Barra de escala, 100  $\mu$ m. **B)** Frecuencia de marcadores morfológicos de inestabilidad de placa en ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> o *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW más rCD. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales por grupo; \*  $p < 0,05$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> + rTW. †  $p < 0,001$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> + rTW; ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. **C)** Actividad de LDH en suero de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> y *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> tratados con rTW solo o rTW y rCD. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo; \*  $p < 0,001$ , frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>+/+</sup> + rTW. †  $p < 0,001$  frente a *ApoE*<sup>-/-</sup> *CD163*<sup>-/-</sup> + rTW. ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni.



independientes. \*  $p < 0,05$  frente al control; †  $p < 0,05$  frente a rTW. Prueba t de Student. **C)** Efecto de CD163 sobre la secreción de CCL2 y CCL5 inducida por TWEAK en CMLV. Las CMLV se incubaron con rTW (100 ng/ml) o rTW más rCD (0,01-0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para detectar CCL2 o CCL5. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes; \*  $p < 0,001$  frente al control; †  $p < 0,001$  frente a rTW; Prueba t de Student.

El entorno inflamatorio mediado por las CMLV durante la formación de las placas de ateroma también es responsable del reclutamiento de las células inmunitarias, especialmente los monocitos/macrófagos. Como anteriormente se observó que el porcentaje de macrófagos en las placas también dependía de la presencia de CD163, analizamos la capacidad migratoria de los macrófagos en diferentes escenarios inflamatorios. Las CMLV se estimularon con rTW en ausencia o presencia de una concentración creciente de rCD durante 24 horas. Después de eso, los sobrenadantes se recogieron y se utilizaron como medio quimioatrayente en ensayos de migración *in vitro* de células RAW 264.7 durante 4 horas. Como se esperaba, el sobrenadante de CMLV estimuladas con rTW aumentó significativamente la migración de macrófagos en comparación con el medio sólo (Fig. 46). Además, la migración de las RAW se inhibió de una manera dosis dependiente tras la incubación con el sobrenadante obtenido de CMLV tratadas con ambos, rTW y rCD (Fig. 46). En general, estos datos indican que CD163 es capaz de bloquear la respuesta proinflamatoria inducida por TWEAK en CMLV, disminuyendo el reclutamiento de macrófagos.



**Figura 46: CD163 disminuye el reclutamiento de macrófagos.** Se sembraron macrófagos peritoneales en la superficie superior de las cámaras de quimiotaxis y se estimularon con los sobrenadantes de CMLV tratadas con FBS al 0% (control), rTW (100 ng/ml) o rTW más rCD (0,1-0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). La cuantificación de las células migradas en diez campos por condición se muestra en el panel derecho. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes; \*  $p < 0,001$  frente al control; †  $p < 0,001$  frente a rTW; Prueba t de Student. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .



## ***DISCUSIÓN***

## Discusión

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad en los países desarrollados, representando 17,3 millones de muertes por año, un número que se espera que aumente a más de 23,6 millones en 2030 (Moran et al., 2014). El remodelado vascular causante de los cambios en la estructura y funcionalidad de los vasos sanguíneos es el evento patológico principal de trastornos cardiovasculares como la aterosclerosis, la reestenosis, la formación de AAA, o la hipertensión, entre otros (Ward et al., 2000). Actualmente, no existe un tratamiento definitivo para poder prevenir estas enfermedades vasculares siendo necesario recurrir a las intervenciones quirúrgicas. Únicamente se ha conseguido retrasar el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas gracias al control farmacológico de factores de riesgo como la diabetes, la hiperlipidemia, o la presión arterial. En este sentido, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que permitan modular con eficacia el remodelado vascular es primordial.

El estudio de moléculas y rutas de señalización implicadas en procesos de remodelado vascular patológico es necesario para mejorar tanto el conocimiento como los tratamientos preventivos de estas enfermedades. En los últimos años, numerosos estudios han descrito la implicación del eje TWEAK/Fn14 en el remodelado vascular de diferentes enfermedades cardiovasculares (Méndez-Barbero et al., 2020). Este eje se encuentra implicado en múltiples procesos biológicos de inflamación, proliferación, migración, etc. aunque se desconoce en su totalidad los mecanismos y mediadores moleculares implicados en esta ruta (Winkles, 2008).

Existía poca información relacionada con los genes y rutas modulados por TWEAK en las CMLV de la pared del vaso por lo que, mediante técnicas de secuenciación masiva del transcriptoma completo, en esta tesis hemos identificado nuevos genes regulados por TWEAK implicados en proliferación de las CMLV. La activación de la ruta TWEAK/Fn14 induce la expresión de CDK4/6 y ciclina D1 y la inhibición de la expresión de p15<sup>INK4a</sup>, genes que se encuentran implicados en el control del ciclo celular. TWEAK regula la expresión de estos genes mediante la señalización por medio de las quinasas ERK1/2 y Akt. Así mismo, mediante el uso de un modelo murino de remodelado vascular de formación de neoíntima tras angioplastia hemos demostrado que el eje TWEAK/Fn14 podría ser una diana terapéutica ya que el anticuerpo bloqueante de TWEAK inhibe la reestenosis postangioplastia. Además, estos datos han sido corroborado en muestras humanas, observándose un aumento de expresión de TWEAK y Fn14 en arterias coronarias humanas con estenosis o reestenosis post-angioplastia (Fig. 47).

Adicionalmente, en este trabajo hemos analizado el papel que desempeña CD163, un potencial receptor basurero de TWEAK, en el desarrollo de la aterosclerosis. Hemos demostrado como su deficiencia aumenta significativamente el desarrollo y progresión de las placas de ateroma en un modelo murino de aterosclerosis inducida por dieta grasa. En particular, hemos descrito que la ausencia de CD163 en macrófagos media la formación de células espumosas mediante la regulación positiva de la expresión de CD36. También hemos demostrado que la falta de CD163 aumenta la presencia de sTWEAK en el microambiente vascular. A su vez, observamos como el pretratamiento con CD163 recombinante es capaz de revertir los efectos proaterogénicos de TWEAK. Con estos datos, proponemos a CD163 como molécula protectora para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis.

En su conjunto, todos los resultados de esta tesis doctoral ponen de manifiesto que el sistema TWEAK/Fn14 podría ser una diana terapéutica para el tratamiento del remodelado vascular patológico asociado tanto a reestenosis post-angioplastia como al desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica.

### 1. El eje TWEAK/Fn14 como diana terapéutica en la reestenosis post-angioplastia.

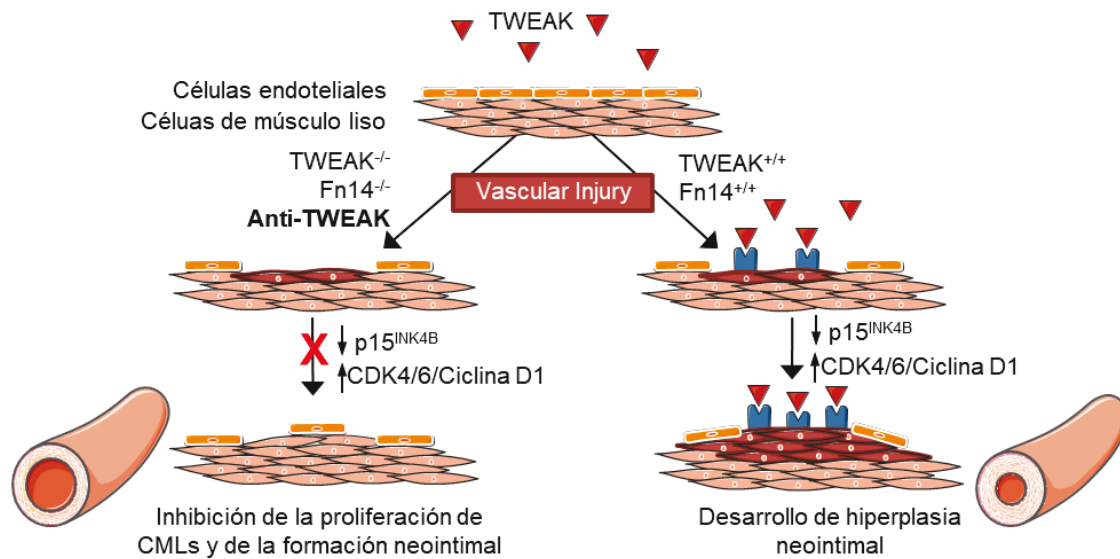
La angioplastia coronaria transluminal percutánea se ha utilizado ampliamente como procedimiento clínico para abrir el flujo sanguíneo de las arterias coronarias bloqueadas (Jukema et al., 2012). Sin embargo, muchos pacientes sometidos a esta intervención quirúrgica experimentan reestenosis postangioplastia, sufriendo una hiperplasia de la íntima que va a impedir la completa recuperación y el posible bloqueo del vaso nuevamente. En este sentido, esta reestenosis del vaso supone un importante obstáculo en el resultado a largo plazo de las intervenciones quirúrgicas. Sin embargo, actualmente se ha conseguido mejorar el pronóstico mediante el uso de stents liberadores de fármacos que reducen la frecuencia y la extensión de la formación de neoíntima (Iakovou et al., 2005).

La reestenosis se define como la respuesta de curación de la pared arterial a la lesión mecánica, e implica un remodelado del vaso por hiperplasia de la íntima, en la que tiene lugar una proliferación y migración de CMLV de la capa media a la íntima. Se ha demostrado previamente que TWEAK participa en varias patologías que cursan con el remodelado vascular. En este sentido, TWEAK aumenta la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo de la placa aterosclerótica en ratones (Muñoz-García et al., 2009; Schapira et al., 2009). Además, TWEAK y Fn14 participan en la degradación de la matriz e inducen la angiogénesis en un modelo de AAA (Tarín et al., 2014). Aunque se sabe que las CMLV son células clave implicadas en el remodelado vascular, hasta ahora no hay estudios centrados en las vías de señalización reguladas por TWEAK en las CMLV. Nuestros estudios, proporcionan por primera vez

la evidencia de un papel fundamental del eje TWEAK/Fn14 en la formación de neoíntima tras angioplastia.

Mediante experimentos de RNA-Seq analizamos el transcriptoma completo de las CMLV extraídas de aortas de ratones salvaje e incubadas en presencia o ausencia de TWEAK. De esta manera, generamos un recurso útil para comprender el efecto de la interacción TWEAK/Fn14 en la biología de las CMLV. El RNA-Seq y su análisis de redes revelaron que una de las principales acciones de TWEAK en CMLV es la regulación de la proliferación celular. Nuestros estudios mecanísticos demostraron que la interacción de TWEAK con su receptor funcional Fn14 induce la proliferación y migración de CMLV a través de la activación de CDK4/6 y ciclina D1 y la inhibición de la expresión de p15<sup>INK4B</sup>. A su vez, esta expresión de p15<sup>INK4B</sup> y ciclina D1 está regulada por la vía de señalización de ERK1/2 y Akt quinasas. Experimentos *in vitro* en CMLV confirmaron que TWEAK promueve la proliferación de CMLV. La acción proliferativa de TWEAK se ha descrito previamente en varios tipos celulares, incluidas las células endoteliales, cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos, queratinocitos, células hepáticas y varias líneas de células tumorales (Donohue et al., 2003; Gao et al., 2009; Novoyatleva et al., 2010; Winkles, 2008). Aunque los mecanismos por los cuales TWEAK induce la proliferación celular son poco conocidos, se ha demostrado previamente que TWEAK induce la regulación positiva de la ciclina D2 y la regulación negativa de p27<sup>kip1</sup> en los cardiomiocitos, todo ello dependiente de la señalización de ERK y PI3K (Novoyatleva et al., 2010). En nuestro estudio, demostramos que TWEAK disminuye la expresión de p15<sup>INK4B</sup>, un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina implicado en la regulación del ciclo celular. Esta regulación negativa de p15<sup>INK4B</sup> mediada por TWEAK es dependiente de la interacción con su receptor Fn14 ya que CMLV de ratones deficientes para Fn14 (*Tnfrsf12a*<sup>-/-</sup>) o CMLV transfectadas con el siRNA de Fn14 bloquean la regulación negativa de p15<sup>INK4B</sup> inducida por TWEAK.

Nuestros hallazgos *in vivo* mostraron que tanto la expresión de ARNm como de proteína de TWEAK y Fn14 se inducen en la pared vascular después de la lesión en ratones de tipo salvaje. Además, la delección génica de TWEAK y Fn14 en ratones deficientes en *Tnfrsf12* o *Tnfrsf12a* protege de la proliferación celular y de la formación de neoíntima. Del mismo modo, el tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK disminuyó la proliferación celular y la formación de neoíntima en la arteria femoral lesionada de ratones salvajes. Además, nuestros resultados han sido trasladados al contexto humano observando como TWEAK y Fn14 se expresan en arterias coronarias humanas estenóticas así como en arterias con reestenosis post-angioplastia, apoyando la identificación del eje TWEAK/Fn14 como posible diana terapéutica (Fig. 47).



**Figura 47: Mecanismo potencial del eje TWEAK/Fn 14 en el desarrollo de la formación de neoíntima tras angioplastia.** El esquema representa la función del eje TWEAK/Fn14 en la formación de neoíntima después de la lesión con guía de angioplastia. La interacción de TWEAK con su receptor Fn14 disminuye p15<sup>INK4B</sup>, aumenta la expresión de ciclina D1, CDK4 y CDK6 mediante la activación de ERK1/2 y Akt en CMLV, lo que lleva a un aumento en la proliferación y migración de CMLV. La intervención terapéutica con el anticuerpo anti-TWEAK reduce la formación de neoíntima.

La proteína p15<sup>INK4B</sup> participa en el mantenimiento del estado en reposo (G0) en diferentes tipos celulares. En las CMLV, la regulación positiva de p15<sup>INK4B</sup> produce la detención de la fase G1 y la inhibición de la fosforilación de pRb (Segev et al., 2011). Además, la sobreexpresión de p15<sup>INK4B</sup> *in vivo* inhibe la hiperplasia de la íntima con stent en conejos (Segev et al., 2011). Sin embargo, aunque la eliminación génica de *Cdkn2B* en ratones acelera la proliferación de CMLV, paradójicamente conduce a lesiones neoíntimales más pequeñas (Leeper et al., 2013). En nuestro estudio, observamos una regulación negativa de la expresión de p15<sup>INK4B</sup> en CMLV tratadas con TWEAK y un aumento de los niveles de p15<sup>INK4B</sup> en ratones deficientes en *Tnfrsf12a* y *Tnfsf12*, un efecto asociado con una disminución en la proliferación celular. En base a estos resultados, es concebible pensar que el efecto de p15<sup>INK4B</sup> en la formación de neoíntima depende de su nivel de expresión dentro de la pared arterial. El mecanismo preciso por el cual TWEAK disminuye p15<sup>INK4B</sup> debe de estar relacionado con la activación de diferentes vías de señalización. En las células endoteliales, TWEAK activa ERK1/2, JNK 1/2 y NF-κB, pero no p38 MAPK (Donohue et al., 2003). Además, TWEAK activa PI3K/Akt en células osteoblásticas (Ando et al., 2006) y ERK 1/2 en CMLV humanas (Hénaut et al., 2016). En nuestro estudio, observamos que TWEAK induce la fosforilación de ERK 1/2, Akt y p65 en CMLV. Está descrito que la activación de ERK tiene un papel esencial en la progresión del ciclo celular en CMLV (Sedding et al., 2009). Utilizando inhibidores específicos, observamos que la inhibición de ERK 1/2 y la activación de Akt impidieron la regulación negativa de p15<sup>INK4B</sup>, lo que indica que el mecanismo por el cual TWEAK disminuye la

expresión de p15<sup>INK4B</sup> puede estar relacionado con la activación de ERK 1/2 y Akt. También hemos observado que TWEAK induce una rápida fosforilación de p65, Akt y ERK, seguida de una fosforilación secundaria y retardada de estas proteínas. Se desconocen los mecanismos que rigen la activación bimodal de p65, Akt y ERK. Esto podría deberse al hecho de que TWEAK regula al alza distintas moléculas como citoquinas, quimioquinas y otros miembros de la superfamilia TNF que podrían ser responsables de esta señal secundaria observada en el tiempo.

p15<sup>INK4B</sup> es un inhibidor conocido de la expresión de CDK4/CDK6 y ciclina D1 en CMLV (Mathew et al., 2010). En consecuencia, observamos un aumento en la expresión de ARNm y proteína de CDK4/CDK6 y ciclina en las CMLV estimuladas con TWEAK. El aumento de estas CDKs y ciclina D1 estuvo acompañado por un aumento en el número de células en la fase S así como en el número de células totales, y una disminución de las células en fase G0/G1. Asimismo, también proporcionamos evidencias de que nuestras observaciones *in vitro* son aplicables *in vivo* al demostrar que la delección de *Tnfrsf12a* o *Tnfrsf12* disminuyó el número de células proliferativas, la expresión de CDK4/6 y de ciclina D1, y aumentó la expresión de p15<sup>INK4B</sup> dando lugar a una menor formación de neoíntima en el modelo murino de lesión vascular con guía de angioplastia.

La proliferación de CMLV se asocia con su plasticidad (Yoshida & Owens, 2005). Las CMLV tienen la capacidad de cambiar de un estado contráctil diferenciado y quiescente a un fenotipo sintético proliferativo y migratorio en respuesta a estímulos del microambiente. En este sentido, hemos demostrado previamente que la estimulación con TWEAK de las CMLV favorece el paso de estas de un fenotipo contráctil a uno sintético (Fernández-Laso et al., 2017). En este sentido, TWEAK disminuye la expresión de marcadores del fenotipo contráctil, como  $\alpha$ -SMA y calponina, y aumenta la expresión de marcadores del fenotipo sintético, como la osteopontina y la MMP9 en las CMLV cultivadas (Fernández-Laso et al., 2017; Tarín et al., 2014). El cambio en el fenotipo inducido por TWEAK está en concordancia con el aumento en la capacidad proliferativa de CMLV observado en nuestro estudio. Sin embargo, es importante tener en cuenta que muchas células derivadas de CMLV que han proliferado en la neoíntima debido a una lesión vascular mantienen la expresión de  $\alpha$ -SMA (Chappell et al., 2016). En este contexto, se ha demostrado previamente que el eje TWEAK/Fn14 aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA durante la diferenciación de miofibroblastos (Novoyatleva et al., 2013). Además, la migración de CMLV es uno de los eventos importantes que contribuye a la formación de neoíntima (Chaabane et al., 2013). Previamente, se ha demostrado que TWEAK aumenta la migración celular en distintos tipos celulares como las células endoteliales (Wiley et al., 2001). Sin embargo, estaba aún sin esclarecer el efecto de TWEAK en la migración de CMLV. En nuestro estudio, demostramos que TWEAK induce la migración de las CMLV. Este efecto está directamente relacionado con la expresión de Fn14 ya que las células que carecen del gen *Tnfrsf12a* no pudieron migrar en respuesta a TWEAK. Estos resultados

apuntan a que, la regulación de la migración celular inducida por el eje TWEAK/Fn14 junto con su papel en la proliferación también puede contribuir al aumento de la formación de lesiones vasculares *in vivo*.

Uno de los hallazgos más importantes en nuestro estudio es la traslacionalidad que podrían tener el uso de la terapia con el anticuerpo bloqueante anti-TWEAK para limitar la formación de neoíntima después de una lesión con guía de angioplastia. Aunque la introducción de stents liberadores de fármacos ha mejorado la prevención y el tratamiento de la reestenosis (Iakovou et al., 2005), la obstrucción neointimal persiste en la mayoría de los casos (Waseda et al., 2009). Actualmente, los agentes citostáticos que se utilizan, como la rapamicina, son relativamente inespecíficos y se asocian con trombosis de stent tardía (Iakovou et al., 2005). Nuestro estudio demostró que el bloqueo de TWEAK con anticuerpos específicos es capaz de recapitular el fenotipo génico obtenido en ratones *Tnfsf12*<sup>-/-</sup>, evitando la proliferación celular después de la lesión al aumentar la expresión de p15<sup>INK4B</sup> y reducir los niveles de expresión de CDK4/6 y ciclina D1 en el vaso lesionado. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la proliferación de CMLV afecta también a otros procesos de remodelado vascular como la aterosclerosis. En concreto, esta proliferación de CMLV se considera perjudicial en las primeras etapas del desarrollo de la placa aterosclerótica pero, sin embargo, tiene un papel protector en lesiones ateroscleróticas avanzadas, ya que la proliferación de estas células estaría permitiendo la formación de una cápsula fibrosa más gruesa que evitaría su rotura (Bennett et al., 2016). Por esa razón, una administración local de bloqueadores de TWEAK/Fn14 a través de stents liberadores de fármacos podría ser una mejor opción para reducir la tasa de reestenosis.

En conclusión, nuestros hallazgos ponen de manifiesto el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 sobre la formación de neoíntima tras angioplastia. TWEAK aumenta la proliferación y migración de CMLV a través de la regulación negativa de p15<sup>INK4B</sup> y positiva de CDK4/6 y ciclina D1. En este estudio proponemos que las terapias destinadas a bloquear la interacción de TWEAK/Fn14 podrían proteger contra la reestenosis producida tras angioplastia.

## 2. El papel de CD163 en la progresión de la lesión aterosclerótica.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y es la patología subyacente más común en las enfermedades de las arterias coronarias, periféricas y de la enfermedad cerebrovascular (Gallino et al., 2014). En las placas ateroscleróticas humanas residen diferentes poblaciones de macrófagos y la diferenciación de dichos macrófagos, tanto a un fenotipo M1 proinflamatorio o M2 antiinflamatorio, depende fundamentalmente del microambiente dentro de las placas (Bouhrel et al., 2007). Los macrófagos de tipo M1 son los encargados de mantener y potenciar la respuesta

inflamatoria que promueve el daño tisular, mientras que los macrófagos de tipo M2 promueven la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos afectados. De hecho, la conversión de los monocitos Ly6Chigh en macrófagos de tipo M2 promueve la regresión de la placa aterosclerótica en modelos murinos (Rahman et al., 2017).

A su vez, los macrófagos M2 se caracterizan por expresar altos niveles del receptor basurero CD163 (Kristiansen et al., 2001b; H. J. Møller et al., 2010). Esta proteína se encuentra expresada en lesiones coronarias, aórticas y femorales humanas (Levy et al., 2007; Moreno et al., 2010; Schaer et al., 2006). CD163 es el encargado de la eliminación de los complejos de Hp-Hb. De hecho, la captación de Hb por los macrófagos que expresan CD163 conduce a un fenotipo de macrófago distinto denominado M (Hb) o Mhem (Finn et al., 2012). Los macrófagos M (Hb) son abundantes en áreas de neoangiogénesis y hemorragia caracterizadas por una producción reducida de citoquinas y una falta de retención de lípidos (Boyle et al., 2012; Finn et al., 2012; Guo et al., 2018). Por estas razones, los macrófagos M (Hb) se han considerado ateroprotectores. Sin embargo, recientemente se ha publicado que los macrófagos M (Hb) promueven la angiogénesis y la permeabilidad vascular acompañadas de inflamación en la aterosclerosis (Guo et al., 2018). Aunque la Hb es un inductor clave de la expresión de CD163, la estimulación de los macrófagos con otras moléculas como las citoquinas pro y antiinflamatorias también puede inducir la polarización de macrófagos a tipo M2 y modular la expresión de CD163 en ausencia de Hb. De hecho, se ha descrito que INF- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  disminuyen la expresión de CD163, y la estimulación de macrófagos con IL-6 o IL-10 aumentan su expresión (Buechler et al., 2000). Es importante señalar que, a diferencia de la Hp humana, la Hp de ratón no promueve la unión de alta afinidad a CD163. Sin embargo, la Hb de ratón tiene una mayor afinidad por CD163 que la Hb humana. La liberación total de Hb es más lenta en ratones deficientes en CD163 y se acumula en el hígado. Sin embargo, la proporción de mHb/mHpHb en suero es similar en ratones *CD163<sup>+/+</sup>* y *CD163<sup>-/-</sup>* (Etzerodt et al., 2013).

Diferentes experimentos *in vitro* han demostrado que los macrófagos que expresan CD163 también pueden unir e internalizar TWEAK (Bover et al., 2007; Moreno et al., 2009). CD163 es por tanto un receptor eliminador o basurero de TWEAK capaz de prevenir sus efectos perjudiciales. En nuestro estudio, utilizamos ratones doble deficientes en *ApoE/CD163* para demostrar el papel que tiene CD163 en el desarrollo y la progresión de la placa aterosclerótica *in vivo*. Hemos observado que la pérdida de CD163 aumenta las concentraciones de TWEAK soluble en ratones deficientes en *ApoE*. De acuerdo con las acciones proinflamatorias y proaterogénicas de TWEAK (Muñoz-García et al., 2009; Sastre et al., 2014; Schapira et al., 2009), los ratones deficientes en *CD163* mostraron un aumento del tamaño de la placa en la ABC. Clínicamente, la composición de la lesión, más que el tamaño o el grado de estenosis de las mismas, determina la probabilidad de la rotura de la placa y las complicaciones



trombóticas posteriores (Libby & Theroux, 2005). Los ratones deficientes en *CD163* presentaron un núcleo necrótico más grande y un aumento en el contenido de lípidos, de infiltrado de macrófagos y de expresión de citoquinas proinflamatorias (CCL2 y CCL5) en lesiones ateroscleróticas.

En un estudio publicado recientemente se describe que, contrario a nuestros resultados, los ratones con doble deficiencia en *ApoE/CD163* mostraron placas más pequeñas en la ABC que ratones control deficientes en *ApoE* (Guo et al., 2018). Sin embargo, los ratones utilizados en dicho estudio son de edad muy avanzada (1 año de edad) y presentan hemorragia intraplaca en sus ABC, a diferencia de los ratones utilizados en nuestro estudio que tienen 12 semanas. En este contexto, es concebible pensar que Hb y TWEAK puedan competir para unirse a CD163 como se demostró *in vitro* (Bover et al., 2007), y que en estos estadios avanzados en los que hay presencia de Hb, la mayor biodisponibilidad de TWEAK favorezca la progresión de la lesión aterosclerótica. CD163 también se expresa en lesiones tempranas de ratones y humanos en las que la hemorragia intraplaca está ausente (Guo et al., 2018; Tarin et al., 2015) y su papel en la progresión de esas lesiones no se ha evaluado previamente.

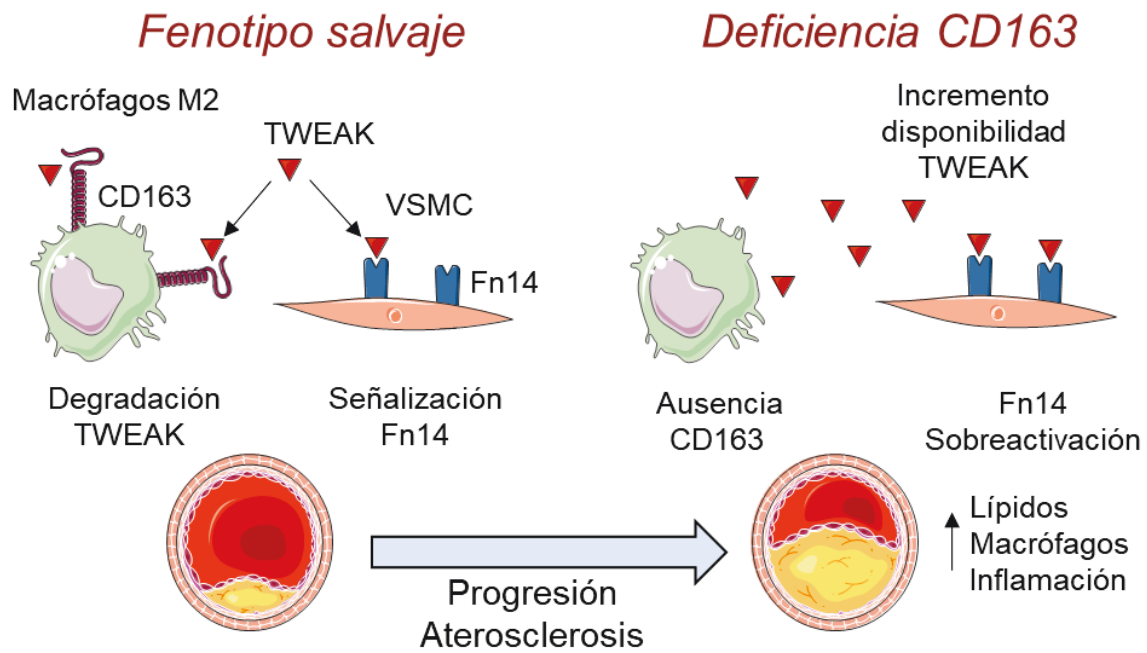
CD163 y TWEAK colocalizan en placas ateroscleróticas tanto de carótida humana como de arteria femoral, lo que sugiere una posible interacción *in vivo* (Moreno et al., 2009, 2010). En consecuencia, se ha descrito que CD163 puede interactuar con TWEAK para regular la regeneración de tejidos después de una lesión isquémica (Akahori et al., 2015). Ahora, nuestro estudio demuestra que CD163 podría prevenir los efectos nocivos de TWEAK durante la progresión de la aterosclerosis. Los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* inyectados con TWEAK mostraron un aumento significativo en la progresión de la aterosclerosis tanto en la raíz aórtica como en la ABC al aumentar el tamaño de la lesión, la acumulación de lípidos y la inflamación en comparación con los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/-</sup>*. Además, los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* inyectados con TWEAK recombinante murino mostraron un aumento en la inestabilidad de la placa presentando un núcleo necrótico más grande y una mayor presencia de cápsulas enterradas y erosión de la media en la ABC que los ratones *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>+/-</sup>*. Cuando los *ApoE<sup>-/-</sup>CD163<sup>-/-</sup>* se pretrataron con CD163 recombinante murino, disminuyeron todos los efectos proaterogénicos de TWEAK. De este modo se observó una disminución en la progresión de la aterosclerosis, con un menor tamaño de la lesión, acumulación de lípidos y contenido inflamatorio a la vez que se mejoró las condiciones de estabilidad de placa con la presencia de un núcleo necrótico más pequeño y una menor frecuencia de cápsulas enterradas y erosión de la media. Todos estos datos indicaban que CD163 estaría bloqueando la señalización de TWEAK *in vivo* y, por tanto, sus efectos perjudiciales relacionados con la evolución de la placa de aterosclerosis.

Además, el papel protector subyacente de CD163 podría estar relacionado con al menos otros dos mecanismos moleculares diferentes. En primer lugar, mostramos que la deficiencia de CD163 promueve la formación de células espumosas mediante una mayor captación de lipoproteínas

modificadas. La captación de LDLox se produce a través de diferentes receptores como CD36 y SR-A (Greaves & Gordon, 2009). En nuestro estudio demostramos que, en ausencia de CD163, el receptor CD36 se regula al alza, sin afectar al transporte reverso de colesterol ni a los niveles de expresión de los transportadores celulares involucrados en este proceso. En consecuencia, se ha demostrado previamente que los macrófagos cuando se polarizan a un fenotipo alternativo pierden su capacidad de retener lípidos dentro de ellos (Finn et al., 2012). De hecho, los macrófagos que expresan CD163 diferenciados con IL-4 muestran una menor capacidad de captación de lípidos. Además, los macrófagos diferenciados con Hb:Hp pierden totalmente su capacidad de formación de células espumosas (Finn et al., 2012).

Un segundo mecanismo es el que tiene que ver con la biodisponibilidad de TWEAK para señalar en presencia o ausencia de CD163. Se ha descrito que tanto las LDLox como las citoquinas proinflamatorias aumentan la expresión de Fn14 en CMLV (Muñoz-García et al., 2006, 2009) y, que bajo esas condiciones, TWEAK activa la señalización de NF-κB y la expresión de diferentes citoquinas (Winkles, 2008). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que CD163 puede inhibir la respuesta proinflamatoria de TWEAK en CMLV, lo que indica que CD163 y Fn14 compiten por la unión de TWEAK. Además, estos resultados se apoyan en que el tratamiento con CD163 recombinante disminuyó la migración de macrófagos inducida por sobrenadantes de CMLV estimuladas con TWEAK.

En conclusión, la delección génica de CD163 en ratones da lugar a un aumento en la concentración de TWEAK circulante. Esta mayor biodisponibilidad de TWEAK para unirse a su receptor funcional Fn14 da lugar a una aceleración en la progresión de la placa aterosclerótica a través del aumento en el contenido de lípidos, la inflamación y el tamaño de la placa (Fig. 48). Además, el tratamiento de ratones deficientes en *CD163* con CD163 recombinante puede mejorar los efectos proinflamatorios y proaterogénicos de TWEAK. Nuestros resultados revelan que los macrófagos que expresan CD163 tienen un papel protector durante el desarrollo de la aterosclerótica, ya que CD163 actúa *in vivo* como un receptor basurero de TWEAK, compitiendo con su único receptor funcional Fn14, y disminuyendo así los efectos perjudiciales de TWEAK.



**Figura 48: Modelo que muestra el mecanismo de actuación de CD163 en aterosclerosis.** Esquema que representa el papel de CD163 como receptor basurero de TWEAK. En condiciones normales, los macrófagos de tipo M2 expresan CD163 y compiten con Fn14 para unirse a TWEAK, lo que limita la disponibilidad de TWEAK para señalizar y producir los efectos proinflamatorios de su interacción con su receptor funcional Fn14. Por el contrario, la ausencia de CD163 en macrófagos aumenta la disponibilidad de TWEAK, favoreciendo la interacción y señalización por Fn14 y promoviendo la progresión de la aterosclerosis.

# ***CONCLUSIONES***

## Conclusiones

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han identificado nuevos genes regulados por TWEAK en CMLV y se ha analizado el papel del eje TWEAK/Fn14 en procesos de remodelado vascular patológico de reestenosis post-angioplastia. A su vez, se ha investigado el papel del receptor de TWEAK, CD163, en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, así como su capacidad para neutralizar los efectos proaterogénicos de TWEAK.

Las conclusiones de este trabajo de investigación son las siguientes:

1. La interacción TWEAK/Fn14 induce la proliferación de CMLV a través de la activación de CDK4/6 y ciclina D1 y la inhibición de la expresión de p15<sup>INK4B</sup>, por un mecanismo de señalización vía dependiente de ERK1/2 y Akt.
2. Tanto la delección génica de *Tnfrsf12a* o *Tnfsf12* como el tratamiento con el anticuerpo bloqueante anti-TWEAK disminuye la proliferación de CMLV y formación de neoíntima tras daño con guía de angioplastia en la femoral de ratón debido a un aumento de la expresión de p15<sup>INK4B</sup> y disminución de CDK4/6 y de ciclina D1.
3. La expresión de TWEAK y Fn14 se induce en lesiones restenóticas de ratones y en arterias coronarias humanas estenóticas y con reestenosis post-angioplastia.
4. La pérdida de CD163 aumenta las concentraciones de TWEAK soluble en ratones deficientes en *ApoE* en un modelo de aterosclerosis inducida por dieta grasa.
5. Los ratones deficientes en *CD163* mostraron un aumento del tamaño de la placa en la ABC con un mayor contenido lipídico, inflamatorio y necrótico.
6. La inyección de TWEAK recombinante en ratones deficientes en *CD163* favorece el desarrollo de placas más inestables con un mayor contenido lipídico e inflamatorio tanto en la ABC como en el seno aórtico.
7. Los efectos proaterogénicos de TWEAK observados en ratones *CD163*<sup>-/-</sup> se redujeron tras el pretratamiento con CD163 recombinante murino.

8. La ausencia de CD163 en los macrófagos de tipo 2 favorece la captación de lipoproteínas modificadas y la formación de células espumosas a través de la regulación positiva de la expresión de CD36.
9. CD163 inhibe la respuesta proinflamatoria de TWEAK en CMLV disminuyendo la activación de NF-KB, la expresión de citoquinas proinflamatorias, MMP, y la migración de macrófagos.

Con todo lo expuesto, el eje TWEAK/Fn14 participa en el remodelado vascular que tiene lugar durante la hiperplasia de la neoíntima tras angioplastia, siendo su regulación una posible diana terapéutica en el tratamiento de esta patología. La expresión del receptor CD163 podría ser un mecanismo protector para prevenir los efectos perjudiciales de TWEAK sobre el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



## Bibliografía

- Agirbasli, M. (2005). Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. In *International Journal of Clinical Practice* (Vol. 59, Issue 1, pp. 102–106). Int J Clin Pract. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2005.00379.x>
- Akahori, H., Karmali, V., Polavarapu, R., Lyle, A. N., Weiss, D., Shin, E., Husain, A., Naqvi, N., Van Dam, R., Habib, A., Choi, C. U., King, A. L., Pachura, K., Taylor, W. R., Lefer, D. J., & Finn, A. V. (2015). CD163 interacts with TWEAK to regulate tissue regeneration after ischaemic injury. *Nature Communications*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms8792>
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., & Dopazo, J. (2007). FatiGO +: A functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 91–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm260>
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., Sanchis-Juan, A., Perez-Gil, D., Marin-Garcia, P., Sanchez, R., Cubuk, C., Hidalgo, M. R., Amadoz, A., Hernansaiz-Ballesteros, R. D., Alemán, A., Tarraga, J., Montaner, D., Medina, I., & Dopazo, J. (2015). Babelomics 5.0: Functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W117–W121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv384>
- Ando, T., Ichikawa, J., Wako, M., Hatsushika, K., Watanabe, Y., Sakuma, M., Tasaka, K., Ogawa, H., Hamada, Y., Yagita, H., & Nakao, A. (2006). TWEAK/Fn14 interaction regulates RANTES production, BMP-2-induced differentiation, and RANKL expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arthritis Research and Therapy*, 8(5), R146. <https://doi.org/10.1186/ar2038>
- Bennett, M. R., Sinha, S., & Owens, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 692–702. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306361>
- Berk, B. C. (2001). Vascular smooth muscle growth: Autocrine growth mechanisms. In *Physiological Reviews* (Vol. 81, Issue 3, pp. 999–1030). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.999>
- Betts, J. G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2017). *Anatomy and Physiology*. Openstax.
- Blanco-Colio, L. M. (2014). TWEAK/Fn14 axis: A promising target for the treatment of cardiovascular diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(JAN), 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00003>
- Blanco-Colio, L. M., Martín-Ventura, J. L., Munoz-Garcia, B., Moreno, J. A., Meilhac, O., Ortiz, A., & Egido, J. (2007). TWEAK and Fn14. New players in the pathogenesis of atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience*, 12(10), 3648–3655. <https://doi.org/10.2741/2341>
- Bodmer, J. L., Schneider, P., & Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 27, Issue 1, pp. 19–26). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01995-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01995-8)
- Boehm, M., & Nabel, E. G. (2001). Cell cycle and cell migration: New pieces to the puzzle. In *Circulation* (Vol. 103, Issue 24, pp. 2879–2881). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.24.2879>
- Bonatti, J., Oberhuber, A., Schachner, T., Zou, Y., Hammerer-Lercher, A., Mittermair, R., & Laufer, G. (2005). Neointimal Hyperplasia in Coronary Vein Grafts: Pathophysiology and Prevention of a Significant Clinical Problem. *The Heart Surgery Forum*, 7(2), 72. <https://doi.org/10.1532/hsf.910>

- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., & Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964–13971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601553200>
- Bouhrel, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., & Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). PPAR $\gamma$  Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism*, 6(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.010>
- Bover, L. C., Cardó-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B. B., Arap, W., & Pasqualini, R. (2007). A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *The Journal of Immunology*, 178(12), 8183–8194. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8183>
- Boyle, J. J., Johns, M., Kampfer, T., Nguyen, A. T., Game, L., Schaer, D. J., Mason, J. C., & Haskard, D. O. (2012). Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. *Circulation Research*, 110(1), 20–33. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247577>
- Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., & Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *Journal of Clinical Investigation*, 97(7), 1715–1722. <https://doi.org/10.1172/JCI118598>
- Brown, S. A. N., Ghosh, A., & Winkles, J. A. (2010). Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17432–17441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131979>
- Brown, S. A. N., Hanscom, H. N., Vu, H., Brew, S. A., & Winkles, J. A. (2006). TWEAK binding to the Fn14 cysteine-rich domain depends on charged residues located in both the A1 and D2 modules. *Biochemical Journal*, 397(2), 297–304. <https://doi.org/10.1042/BJ20051362>
- Brown, S. A. N., Richards, C. M., Hanscom, H. N., Feng, S. L. Y., & Winkles, J. A. (2003). The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochemical Journal*, 371(2), 395–403. <https://doi.org/10.1042/BJ20021730>
- Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., & Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), 97–103. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.97>
- Burkly, L. C., Michaelson, J. S., Hahm, K., Jakubowski, A., & Zheng, T. S. (2007). TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: Role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. In *Cytokine* (Vol. 40, Issue 1, pp. 1–16). Cytokine. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.007>
- CA, S., T, F., & RG, G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90372-7)
- Campbell, S., Michaelson, J., Burkly, L., & Putterman, C. (2004). The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (Vol. 9, pp. 2273–2284). Front Biosci. <https://doi.org/10.2741/1395>
- Chaabane, C., Otsuka, F., Virmani, R., & Bochaton-Piallat, M.-L. (2013). Biological responses in stented arteries. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt115>
- Chang, C.-C., & Ong, E.-T. (2005). *Coronary Restenosis*.

- Chappell, J., Harman, J. L., Narasimhan, V. M., Yu, H., Foote, K., Simons, B. D., Bennett, M. R., & Jørgensen, H. F. (2016). Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circulation Research*, 119(12), 1313–1323. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309799>
- Chen, H. N., Wang, D. J., Ren, M. Y., Wang, Q. L., & Sui, S. J. (2012). TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF-κB pathway. *Molecular Biology Reports*, 39(8), 8231–8241. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1671-3>
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., & Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32401–32410. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32401>
- Chorianopoulos, E., Heger, T., Lutz, M., Frank, D., Bea, F., Katus, H. A., & Frey, N. (2010). FGF-inducible 14-kDa protein (Fn14) is regulated via the RhoA/ROCK kinase pathway in cardiomyocytes and mediates nuclear factor-kappaB activation by TWEAK. *Basic Research in Cardiology*, 105(2), 301–313. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0046-y>
- Damås, J. K., Smith, C., Øie, E., Fevang, B., Halvorsen, B., Wæhre, T., Boullier, A., Breland, U., Yndestad, A., Ovchinnikova, O., Robertson, A. K. L., Sandberg, W. J., Kjekshus, J., Taskén, K., Frøland, S. S., Gullestad, L., Hansson, G. K., Quehenberger, O., & Aukrust, P. (2007). Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: Possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(3), 614–620. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000255581.38523.7c>
- Desplat-Jégo, S., Varriale, S., Creidy, R., Terra, R., Bernard, D., Khrestchatsky, M., Izui, S., Chicheportiche, Y., & Boucraut, J. (2002). TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity. *Journal of Neuroimmunology*, 133(1–2), 116–123. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00368-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00368-5)
- Donohue, P. J., Richards, C. M., Brown, S. A. N., Hanscom, H. N., Buschman, J., Thangada, S., Hla, T., Williams, M. S., & Winkles, J. A. (2003). TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 594–600. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000062883.93715.37>
- Dzau, V. J., Braun-Dullaeus, R. C., & Sedding, D. G. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. In *Nature Medicine* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1249–1256). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm1102-1249>
- Egido, J., Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., & Ortiz, A. (2011). Animal models of cardiovascular diseases. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2011). J Biomed Biotechnol. <https://doi.org/10.1155/2011/497841>
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. In *Science* (Vol. 274, Issue 5293, pp. 1664–1672). Science. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1664>
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
- Epstein, F. H., Gibbons, G. H., & Dzau, V. J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 330, Issue 20, pp. 1431–1438). Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJM199405193302008>

- Esteban, V., Méndez-Barbero, N., Jiménez-Borreguero, L. J., Roqué, M., Novensá, L., García-Redondo, A. B., Salaices, M., Vila, L., Arbonés, M. L., Campanero, M. R., & Redondo, J. M. (2011). Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 2125–2139. <https://doi.org/10.1084/jem.20110503>
- Etzerodt, A., Kjolby, M., Nielsen, M. J., Maniecki, M., Svendsen, P., & Moestrup, S. K. (2013). Plasma clearance of hemoglobin and haptoglobin in mice and effect of CD163 gene targeting disruption. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(17), 2254–2263. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4605>
- Etzerodt, A., & Moestrup, S. K. (2013). CD163 and inflammation: Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 18, Issue 17, pp. 2352–2363). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>
- Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watt, G. F., Borén, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., Van De Sluis, B., Taskinen, M. R., ... Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, 38(32), 2459–2472. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx144>
- Fernández-Laso, V., Sastre, C., Méndez-Barbero, N., Egido, J., Martín-Ventura, J. L., Gómez-Guerrero, C., & Blanco-Colio, L. M. (2017). TWEAK blockade decreases atherosclerotic lesion size and progression through suppression of STAT1 signaling in diabetic mice. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep46679>
- Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 30, Issue 7, pp. 1282–1292). Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179739>
- Finn, A. V., Nakano, M., Polavarapu, R., Karmali, V., Saeed, O., Zhao, X. Q., Yazdani, S., Otsuka, F., Davis, T., Habib, A., Narula, J., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2012). Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(2), 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.10.852>
- Foster, D., Parrish-Novak, J., Fox, B., & Xu, W. (2004). Cytokine-receptor pairing: Accelerating discovery of cytokine function. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 2, pp. 160–170). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1305>
- Gallino, A., Aboyans, V., Diehm, C., Cosentino, F., Stricker, H., Falk, E., Schouten, O., Lekakis, J., Amann-Vesti, B., Siclari, F., Poredos, P., Novo, S., Brodmann, M., Schulte, K. L., Vlachopoulos, C., De Caterina, R., Libby, P., & Baumgartner, I. (2014). Non-coronary atherosclerosis. *European Heart Journal*, 35(17), 1112–1119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu071>
- Gao, H. X., Campbell, S. R., Burkly, L. C., Jakubowski, A., Jarchum, I., Banas, B., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Berman, J. W., Michaelson, J. S., & Putterman, C. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells. *Cytokine*, 46(1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.001>
- García-Alonso, L., Alonso, R., Vidal, E., Amadoz, A., De María, A., Minguez, P., Medina, I., & Dopazo, J. (2012). *Discovering the hidden sub-network component in a ranked list of genes or proteins derived from genomic experiments*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks699>
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2012). Animal models of Atherosclerosis. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 32, Issue 5, pp. 1104–1115). Arterioscler Thromb Vasc Biol. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237693>

- Girgenrath, M., Weng, S., Kostek, C. A., Browning, B., Wang, M., Brown, S. A. N., Winkles, J. A., Michaelson, J. S., Allaire, N., Schneider, P., Scott, M. L., Hsu, Y. M., Yagita, H., Flavell, R. A., Miller, J. B., Burkly, L. C., & Zheng, T. S. (2006). TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO Journal*, 25(24), 5826–5839. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601441>
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001a). Atherosclerosis: The road ahead. In *Cell* (Vol. 104, Issue 4, pp. 503–516). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00238-0)
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001b). Atherosclerosis: The road ahead. In *Cell* (Vol. 104, Issue 4, pp. 503–516). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00238-0)
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Issue 12, pp. 953–964). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Greaves, D. R., & Gordon, S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: Current knowledge and future challenges. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 50, Issue SUPPL., pp. S282–S286). <https://doi.org/10.1194/jlr.R800066-JLR200>
- Guo, L., Akahori, H., Harari, E., Smith, S. L., Polavarapu, R., Karmali, V., Otsuka, F., Gannon, R. L., Braumann, R. E., Dickinson, M. H., Gupta, A., Jenkins, A. L., Lipinski, M. J., Kim, J., Chhour, P., De Vries, P. S., Jinnouchi, H., Kutys, R., Mori, H., ... Finn, A. V. (2018). CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(3), 1106–1124. <https://doi.org/10.1172/JCI93025>
- Han, S., Yoon, K., Lee, K., Kim, K., Jang, H., Lee, N. K., Hwang, K., & Lee, S. Y. (2003). TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF- $\kappa$ B through TNF receptor-associated factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(4), 789–796. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00852-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00852-0)
- Hannon, G. J., & Beach, D. (1994). p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature*, 371(6494), 257–261. <https://doi.org/10.1038/371257a0>
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. In *Nature Immunology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 204–212). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.2001>
- Harada, N., Nakayama, M., Nakano, H., Fukuchi, Y., Yagita, H., & Okumura, K. (2002). Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), 488–493. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02670-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02670-0)
- Heeneman, S., Sluimer, J. C., & Daemen, M. J. A. P. (2007). Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. In *Circulation Research* (Vol. 101, Issue 5, pp. 441–454). Circ Res. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148338>
- Hénaut, L., Sanz, A. B., Martin-Sanchez, D., Carrasco, S., Villa-Bellosta, R., Aldamiz-Echevarria, G., Massy, Z. A., Sanchez-Nino, M. D., & Ortiz, A. (2016). Tweak favors phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells through canonical and non-canonical activation of NF $\kappa$ B. *Cell Death and Disease*, 7(7), e2305–e2305. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.220>
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopaschuk, G., & Opie, L. (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. In *The Lancet* (Vol. 383, Issue 9932, pp. 1933–1943). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60107-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60107-0)
- Hilgendorf, I., Swirski, F. K., & Robbins, C. S. (2015). Monocyte fate in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(2), 272–279. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303565>



- Hu, W., Polinsky, P., Sadoun, E., Rosenfeld, M. E., & Schwartz, S. M. (2005). Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of ApoE knockout mice. *Cardiovascular Pathology*, 14(3), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.02.004>
- Huang, H., Virmani, R., Younis, H., Burke, A. P., Kamm, R. D., & Lee, R. T. (2001). The Impact of Calcification on the Biomechanical Stability of Atherosclerotic Plaques. *Circulation*, 103(8), 1051–1056. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.8.1051>
- Iakovou, I., Schmidt, T., Bonizzoni, E., Ge, L., Sangiorgi, G. M., Stankovic, G., Airoldi, F., Chieffo, A., Montorfano, M., Carlino, M., Michev, I., Corvaja, N., Briguori, C., Gerckens, U., Grube, E., & Colombo, A. (2005). Incidence, predictors and outcome of thrombosis after succesful implantation of drug-eluting stents. *Journal of the American Medical Association*, 293(17), 2126–2130. <https://doi.org/10.1001/jama.293.17.2126>
- Jain, M., Jakubowski, A., Cui, L., Shi, J., Su, L., Bauer, M., Guan, J., Lim, C. C., Naito, Y., Thompson, J. S., Sam, F., Ambrose, C., Parr, M., Crowell, T., Lincecum, J. M., Wang, M. Z., Hsu, Y. M., Zheng, T. S., Michaelson, J. S., ... Burkly, L. C. (2009). A novel role for tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (tweak) in the development of cardiac dysfunction and failure. *Circulation*, 119(15), 2058–2068. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.837286>
- Jukema, J. W., Verschuren, J. J. W., Ahmed, T. A. N., & Quax, P. H. A. (2012). Restenosis after PCI. Part 1: Pathophysiology and risk factors. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 53–62). Nat Rev Cardiol. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.132>
- Justo, P., Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Winkles, J. A., Lorz, C., Egido, J., & Ortiz, A. (2006). Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK. *Kidney International*, 70(10), 1750–1758. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001866>
- Kalinina, N., Agrotis, A., Antropova, Y., DiVitto, G., Kanellakis, P., Kostolias, G., Ilyinskaya, O., Tararak, E., & Bobik, A. (2004). Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: Role of activated macrophages and cytokines. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(12), 2320–2325. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000145573.36113.8a>
- Kaplan, M. J., Lewis, E. E., Shelden, E. A., Somers, E., Pavlic, R., McCune, W. J., & Richardson, B. C. (2002). The Apoptotic Ligands TRAIL, TWEAK, and Fas Ligand Mediate Monocyte Death Induced by Autologous Lupus T Cells. *The Journal of Immunology*, 169(10), 6020–6029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.6020>
- Ketelhuth, D. F. J., & Bäck, M. (2011). The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. In *Current Atherosclerosis Reports* (Vol. 13, Issue 2, pp. 162–169). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11883-010-0159-7>
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A. T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., & Caligiuri, G. (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008852>
- Kim, S.-H., Kang, Y.-J., Kim, W.-J., Woo, D.-K., Lee, Y., Kim, D.-I., Park, Y. B., Kwon, B. S., Park, J.-E., & Lee, W.-H. (2004). TWEAK Can Induce Pro-Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinase-9 in Macrophages. *Circulation Journal*, 68(4), 396–399. <https://doi.org/10.1253/circj.68.396>
- Kim, S.-H., Lee, W.-H., Kwon, B. S., Oh, G. T., Choi, Y.-H., & Park, J.-E. (2001). Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 12 may Destabilize Atherosclerotic Plaques by Inducing Matrix Metalloproteinases. *Japanese Circulation Journal*, 65(2), 136–138. <https://doi.org/10.1253/jcj.65.136>
- Koepp, D. M., Harper, J. W., & Elledge, S. J. (1999). How the cyclin became a cyclin: Regulated

- proteolysis in the cell cycle. In *Cell* (Vol. 97, Issue 4, pp. 431–434). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80753-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80753-9)
- Korner, P. I., Angus, J. A., & Mulvany, M. J. (1997). Vascular remodeling. In *Hypertension* (Vol. 29, Issue 4, pp. 1065–1066). [https://doi.org/10.1016/00201-3839\(59\)68939-](https://doi.org/10.1016/00201-3839(59)68939-)
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K. A., & Moestrup, S. K. (2001a). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K. A., & Moestrup, S. K. (2001b). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Lassègue, B., & Griendling, K. K. (2010). NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 653–661). Arterioscler Thromb Vasc Biol. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181610>
- Latham, R. D., Westerhof, N., Sipkema, P., Rubal, B. J., Reuderink, P., & Murgo, J. P. (1985). Regional wave travel and reflections along the human aorta: A study with six simultaneous micromanometric pressures. *Circulation*, 72(6), 1257–1269. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.72.6.1257>
- Law, S. K. A., Micklem, K. J., Shaw, J. M., Zhang, X. -P, Dong, Y., Willis, A. C., & Mason, D. Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European Journal of Immunology*, 23(9), 2320–2325. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230940>
- Leeper, N. J., Raiesdana, A., Kojima, Y., Kundu, R. K., Cheng, H., Maegdefessel, L., Toh, R., Ahn, G. O., Ali, Z. A., Ryan Anderson, D., Miller, C. L., Roberts, S. C., Spin, J. M., De Almeida, P. E., Wu, J. C., Xu, B., Cheng, K., Quertermous, M., Kundu, S., ... Quertermous, T. (2013). Loss of CDKN2B promotes p53-dependent smooth muscle cell apoptosis and aneurysm formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(1). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300399>
- Leitinger, N., & Schulman, I. G. (2013). Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1120–1126. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300173>
- Levy, A. P., Purushothaman, K. R., Levy, N. S., Purushothaman, M., Strauss, M., Asleh, R., Marsh, S., Cohen, O., Moestrup, S. K., Moller, H. J., Zias, E. A., Benhayon, D., Fuster, V., & Moreno, P. R. (2007). Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: Implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. *Circulation Research*, 101(1), 106–110. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149435>
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
- Libby, P., & Hansson, G. K. (2015). Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree: Players and Layers. *Circ Res*, 116(2), 307–311. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.301313>
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. In *Nature* (Vol. 473, Issue 7347, pp. 317–325). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature10146>
- Libby, P., & Theroux, P. (2005). Pathophysiology of coronary artery disease. In *Circulation* (Vol. 111,



- Issue 25, pp. 3481–3488). Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878>
- Liu, Q., Xiao, S., & Xia, Y. (2017). TWEAK/Fn14 Activation Participates in Skin Inflammation. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/6746870>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. In *Cell* (Vol. 104, Issue 4, pp. 487–501). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Louis, S. F., & Zahradka, P. (2010). Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. In *Experimental and Clinical Cardiology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 204–237). Pulsus Group. [/pmc/articles/PMC3016065/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2016065/)
- Lu, Y., & Wahl, L. M. (2005). Oxidative Stress Augments the Production of Matrix Metalloproteinase-1, Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E<sub>2</sub> through Enhancement of NF- $\kappa$ B Activity in Lipopolysaccharide-Activated Human Primary Monocytes. *The Journal of Immunology*, 175(8), 5423–5429. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5423>
- Madrigal-Matute, J., Fernandez-Laso, V., Sastre, C., Llamas-Granda, P., Egido, J., Martin-Ventura, J. L., Zalba, G., & Blanco-Colio, L. M. (2015). TWEAK/Fn14 interaction promotes oxidative stress through NADPH oxidase activation in macrophages. *Cardiovascular Research*, 108(1), 139–147. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv204>
- Maeker, H., Varfolomeev, E., Kischkel, F., Lawrence, D., LeBlanc, H., Lee, W., Hurst, S., Danilenko, D., Li, J., Filvaroff, E., Yang, B., Daniel, D., & Ashkenazi, A. (2005). TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*, 123(5), 931–944. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.022>
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A., & Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Current Biology*, 8(9), 525–528. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70204-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70204-0)
- Martín-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M., Muñoz-García, B., Gómez-Hernández, A., Arribas, A., Ortega, L., Tuñón, J., & Egido, J. (2004). NF- $\kappa$ B Activation and Fas Ligand Overexpression in Blood and Plaques of Patients with Carotid Atherosclerosis: Potential Implication in Plaque Instability. *Stroke*, 35(2), 458–463. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000114876.51656.7A>
- Martin-Ventura, J., Rodrigues-Diez, R., Martinez-Lopez, D., Salaices, M., Blanco-Colio, L., & Briones, A. (2017). Oxidative Stress in Human Atherothrombosis: Sources, Markers and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2315. <https://doi.org/10.3390/ijms18112315>
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., & De Meyer, G. R. Y. (2011). Necrotic cell death in atherosclerosis. In *Basic Research in Cardiology* (Vol. 106, Issue 5, pp. 749–760). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0192-x>
- Mathew, O. P., Ranganna, K., & Yatsu, F. M. (2010). Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64(10), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.09.017>
- McMonagle, M. P. (2020). The quest for effective pharmacological suppression of neointimal hyperplasia. *Current Problems in Surgery*, 57(8), 100807. <https://doi.org/10.1016/j.cpsurg.2020.100807>
- Meighan-Mantha, R. L., Hsu, D. K. W., Guo, Y., Brown, S. A. N., Feng, S. L. Y., Peifley, K. A., Alberts, G. F., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Richards, C. M., & Winkles, J. A. (1999). The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast

- adhesion and migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33166–33176. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33166>
- Méndez-Barbero, N., Gutiérrez-Muñoz, C., Blázquez-Serra, R., Martín-Ventura, J., & Blanco-Colio, L. (2020). Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK)/Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 (Fn14) Axis in Cardiovascular Diseases: Progress and Challenges. *Cells*, 9(2), 405. <https://doi.org/10.3390/cells9020405>
- Mendez-Barbero, N., Yuste-Montalvo, A., Nuñez-Borque, E., Jensen, B. M., Gutiérrez-Muñoz, C., Tome-Amat, J., Garrido-Arandia, M., Díaz-Perales, A., Ballesteros-Martinez, C., Laguna, J. J., Beitia, J. M., Poulsen, L. K., Cuesta-Herranz, J., Blanco-Colio, L. M., & Esteban, V. (2020). The TNF-like weak inducer of the apoptosis/fibroblast growth factor-inducible molecule 14 axis mediates histamine and platelet-activating factor-induced subcutaneous vascular leakage and anaphylactic shock. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.019>
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 36, Issue 6, pp. 320–328). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. In *Trends in Cardiovascular Medicine* (Vol. 18, Issue 6, pp. 228–232). Trends Cardiovasc Med. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.004>
- Michaelson, J. S., Cho, S., Browning, B., Zheng, T. S., Lincecum, J. M., Wang, M. Z., Hsu, Y. M., & Burkly, L. C. (2005). Tweak induces mammary epithelial branching morphogenesis. *Oncogene*, 24(16), 2613–2624. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208208>
- Møller, H. J., Nielsen, M. J., Maniecki, M. B., Madsen, M., & Moestrup, S. K. (2010). Soluble macrophage-derived CD163: A homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin-hemoglobin binding. *Immunobiology*, 215(5), 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.05.003>
- Møller, Holger Jon, Peterslund, N. A., Graversen, J. H., & Moestrup, S. K. (2002). Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood*, 99(1), 378–380. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.378>
- Montaner, D., & Dopazo, J. (2010). Multidimensional Gene Set Analysis of Genomic Data. *PLoS ONE*, 5(4), e10348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010348>
- Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 709–721). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri3520>
- Moran, A. E., Forouzanfar, M. H., Roth, G. A., Mensah, G. A., Ezzati, M., Murray, C. J. L., & Naghavi, M. (2014). Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: The global burden of disease 2010 study. In *Circulation* (Vol. 129, Issue 14, pp. 1483–1492). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004042>
- Moreno, J. A., Dejouvencel, T., Labreuche, J., Smadja, D. M., Dussiot, M., Martin-Ventura, J. L., Egido, J., Gaussem, P., Emmerich, J., Michel, J. B., Blanco-Colio, L. M., & Meilhac, O. (2010). Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1253–1262. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.203364>
- Moreno, J. A., Muñoz-García, B., Martín-Ventura, J. L., Madrigal-Matute, J., Orbe, J., Páramo, J. A., Ortega, L., Egido, J., & Blanco-Colio, L. M. (2009). The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK. Potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 207(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.033>

- Moreno, J. A., Sastre, C., Madrigal-Matute, J., Muñoz-García, B., Ortega, L., Burkly, L. C., Egido, J., Martín-Ventura, J. L., & Blanco-Colio, L. M. (2013). HMGB1 expression and secretion are increased via TWEAK-Fn14 interaction in atherosclerotic plaques and cultured monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 612–620. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300874>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 958–969). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mulvany, M. J. (1998). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on vascular remodeling of resistance vessels in hypertensive patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 47(SUPPL.1), 20–23. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(98\)90366-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(98)90366-3)
- Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J. A., Martín-Ventura, J. L., López-Franco, O., Sastre, C., Ortega, L., Burkly, L. C., Egido, J., & Blanco-Colio, L. M. (2011). TWEAK/Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 89(1), 225–233. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq278>
- Muñoz-García, B., Martín-Ventura, J. L., Martínez, E., Sánchez, S., Hernández, G., Ortega, L., Ortiz, A., Egido, J., & Blanco-Colio, L. M. (2006). Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: Modulation by atorvastatin. *Stroke*, 37(8), 2044–2053. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000230648.00027.00>
- Muñoz-García, B., Moreno, J. A., López-Franco, O., Sanz, A. B., Martín-Ventura, J. L., Blanco, J., Jakubowski, A., Burkly, L. C., Ortiz, A., Egido, J., & Blanco-Colio, L. M. (2009). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(12), 2061–2068. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194852>
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 79, pp. 541–566). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
- Mustonen, E., Säkkinen, H., Tokola, H., Isopoussu, E., Aro, J., Leskinen, H., Ruskoaho, H., & Rysä, J. (2010). Tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and its receptor Fn14 during cardiac remodelling in rats. *Acta Physiologica*, 199(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02080.x>
- Nabel, E. G. (2002). CDKS and CKIS: Molecular targets for tissue remodelling. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 1, Issue 8, pp. 587–598). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd869>
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14(1), 133–140. <https://doi.org/10.1161/01.atv.14.1.133>
- Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K., & Yagita, H. (2000). Involvement of TWEAK in interferon  $\gamma$ -stimulated monocyte cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1373–1379. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1373>
- Newby, A. C., & Zaltsman, A. B. (2000). Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. In *Journal of Pathology* (Vol. 190, Issue 3, pp. 300–309). John Wiley & Sons, Ltd. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I)
- Nielsen, M. C., Hvidbjerg Gantzel, R., Clària, J., Trebicka, J., Møller, H. J., & Grønbaek, H. (2020). Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. In *Cells*

- (Vol. 9, Issue 5, p. 1175). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051175>
- Nielsen, M. J. (2006). The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(4), 837–845. <https://doi.org/10.1189/jlb.1005602>
- Novoyatleva, T., Diehl, F., Van Amerongen, M. J., Patra, C., Ferrazzi, F., Bellazzi, R., & Engel, F. B. (2010). TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Research*, 85(4), 681–690. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp360>
- Novoyatleva, T., Schymura, Y., Janssen, W., Strobl, F., Swiercz, J. M., Patra, C., Posern, G., Wietelmann, A., Zheng, T. S., Schermuly, R. T., & Engel, F. B. (2013). Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, 108(2), 325. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0325-x>
- Pashova, A., Work, L. M., & Nicklin, S. A. (2020). The role of extracellular vesicles in neointima formation post vascular injury. In *Cellular Signalling* (Vol. 76, p. 109783). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109783>
- Perper, S. J., Browning, B., Burkly, L. C., Weng, S., Gao, C., Giza, K., Su, L., Tarilonte, L., Crowell, T., Rajman, L., Runkel, L., Scott, M., Atkins, G. J., Findlay, D. M., Zheng, T. S., & Hess, H. (2006). TWEAK Is a Novel Arthritogenic Mediator. *The Journal of Immunology*, 177(4), 2610–2620. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2610>
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., & Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343–353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-G)
- Rahman, K., Vengrenyuk, Y., Ramsey, S. A., Vila, N. R., Girgis, N. M., Liu, J., Gusarova, V., Gromada, J., Weinstock, A., Moore, K. J., Loke, P., & Fisher, E. A. (2017). Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *Journal of Clinical Investigation*, 127(8), 2904–2915. <https://doi.org/10.1172/JCI75005>
- Rekhter, M. D. (2002). How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? In *Cardiovascular Research* (Vol. 54). [www.elsevier.com/locate/cardiores](http://www.elsevier.com/locate/cardiores)
- Renna, N. F., De Las Heras, N., & Miatello, R. M. (2013). Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. In *International Journal of Hypertension* (Vol. 2013). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2013/808353>
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. In *Science* (Vol. 302, Issue 5651, pp. 1704–1709). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>
- Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Zhang, W. X., Taubman, M. B., & Reis, E. D. (2000). Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2), 335–342. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.2.335>
- Rosenfeld, M. E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., & Schwartz, S. M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(12), 2587–2592. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.12.2587>
- Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., & Gladwin, M. T. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. In *Journal of the American Medical Association* (Vol. 293, Issue 13, pp. 1653–1662). JAMA.

- <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>
- Saitoh, T., Nakayama, M., Nakano, H., Yagita, H., Yamamoto, N., & Yamaoka, S. (2003). TWEAK induces NF- $\kappa$ B p100 processing and long lasting NF- $\kappa$ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36005–36012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304266200>
- Sastre, C., Fernández-Laso, V., Madrigal-Matute, J., Muñoz-García, B., Moreno, J. A., Pastor-Vargas, C., Llamas-Granda, P., Burkly, L. C., Egido, J., Martín-Ventura, J. L., & Blanco-Colio, L. M. (2014). Genetic deletion or <scp>TWEAK</scp> blocking antibody administration reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(4), 721–734. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12221>
- Schaer, C. A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M. O., & Schaer, D. J. (2006). Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation Research*, 99(9), 943–950. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000247067.34173.1b>
- Schaper, W., & Ito, W. D. (1996). Molecular Mechanisms of Coronary Collateral Vessel Growth. *Circulation Research*, 79(5), 911–919. <https://doi.org/10.1161/01.RES.79.5.911>
- Schapira, K., Burkly, L. C., Zheng, T. S., Wu, P., Groeneweg, M., Rousch, M., Kockx, M. M., Daemen, M. J. A. P., & Heeneman, S. (2009). Fn14-Fc fusion protein regulates atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice and inhibits macrophage lipid uptake in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(12), 2021–2027. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.195040>
- Schwartz, S. M. (1997). Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 99, Issue 12, pp. 2814–2817). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/jci119472>
- Sedding, D. G., Tröbs, M., Reich, F., Walker, G., Fink, L., Haberbosch, W., Rau, W., Tillmanns, H., Preissner, K. T., Bohle, R. M., & Langheinrich, A. C. (2009). 3-Deazaadenosine prevents smooth muscle cell proliferation and neointima formation by interfering with ras signaling. *Circulation Research*, 104(10), 1192–1200. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.194357>
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9), 726–735. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601337>
- Segev, A., Nili, N., Qiang, B., Oshero, A. B., Giordano, F. J., Jaffe, R., Gaudie, J., Sparkes, J. D., Fraser, A. R., Ladouceur-Wodzak, M., Butany, J., & Strauss, B. H. (2011). Inhibition of intimal hyperplasia after stenting by over-expression of p15: A member of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(3), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.007>
- Sherr, C. J. (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. In *Proceedings of the Association of American Physicians* (Vol. 107, Issue 2, pp. 181–186). Proc Assoc Am Physicians. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8624851/>
- Sherr, Charles J., & Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes and Development*, 18(22), 2699–2711. <https://doi.org/10.1101/gad.1256504>
- Skålén, K., Gustafsson, M., Knutsen Rydberg, E., Hultén, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L., & Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417(6890), 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature00804>
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462–2478.



<https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.5.2462>

- Stefanadis, C., Antoniou, C. K., Tsiachris, D., & Pietri, P. (2017). Coronary atherosclerotic vulnerable plaque: Current perspectives. In *Journal of the American Heart Association* (Vol. 6, Issue 3). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005543>
- Stöger, J. L., Gijbels, M. J. J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C. M., Biessen, E. A. L., Daemen, M. J. A. P., Lutgens, E., & de Winther, M. P. J. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225(2), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013>
- Stoll, G., & Bendszus, M. (2006). Inflammation and atherosclerosis: Novel insights into plaque formation and destabilization. In *Stroke* (Vol. 37, Issue 7, pp. 1923–1932). Stroke. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000226901.34927.10>
- Sulahian, T. H., Hintz, K. A., Wardwell, K., & Guyre, P. M. (2001). Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *Journal of Immunological Methods*, 252(1–2), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00328-3)
- Tanabe, K., Bonilla, I., Winkles, J. A., & Strittmatter, S. M. (2003). Fibroblast Growth Factor-Inducible-14 Is Induced in Axotomized Neurons and Promotes Neurite Outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 23(29), 9675–9686. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-29-09675.2003>
- Tarin, C., Carril, M., Martin-Ventura, J. L., Markuerkiaga, I., Padro, D., Llamas-Granda, P., Moreno, J. A., García, I., Genicio, N., Plaza-Garcia, S., Blanco-Colio, L. M., Penades, S., & Egido, J. (2015). Targeted gold-coated iron oxide nanoparticles for CD163 detection in atherosclerosis by MRI. *Scientific Reports*, 5(1), 17135. <https://doi.org/10.1038/srep17135>
- Tarín, C., Fernández-Laso, V., Sastre, C., Madrigal-Matute, J., Gómez, M., Zaragoza, C., Egido, J., Burkly, L. C., Martín-Ventura, J. L., & Blanco-Colio, L. M. (2014). Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis or Fn14 Deficiency Reduce Elastase Perfusion-Induced Aortic Abdominal Aneurysm in Mice. *Journal of the American Heart Association*, 3(4). <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000723>
- Thomsen, H. H., Møller, H. J., Trolle, C., Groth, K. A., Skakkebæk, A., Bojesen, A., Høst, C., & Gravholt, C. H. (2013). The macrophage low-grade inflammation marker sCD163 is modulated by exogenous sex steroids. *Endocrine Connections*, 2(4), 216–224. <https://doi.org/10.1530/ec-13-0067>
- Tirnitz-Parker, J. E. E., Viebahn, C. S., Jakubowski, A., Klopčič, B. R. S., Olynyk, J. K., Yeoh, G. C. T., & Knight, B. (2010). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells. *Hepatology*, 52(1), 291–302. <https://doi.org/10.1002/hep.23663>
- Tran, N. L., McDonough, W. S., Savitch, B. A., Sawyer, T. F., Winkles, J. A., & Berens, M. E. (2005). The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NFκB pathway activation and BCL-XL/BCL-W expression. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3483–3492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409906200>
- Urbonaviciene, G., Martin-Ventura, J. L., Lindholt, J. S., Urbonavicius, S., Moreno, J. A., Egido, J., & Blanco-Colio, L. M. (2011). Impact of soluble TWEAK and CD163/TWEAK ratio on long-term cardiovascular mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 219(2), 892–899. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.016>
- Wang, A., Zhang, F., Xu, H., Xu, M., Cao, Y., Wang, C., Xu, Y., Su, M., Zhang, M., & Zhuge, Y. (2017). TWEAK/Fn14 promotes pro-inflammatory cytokine secretion in hepatic stellate cells via NF-κB/STAT3 pathways. *Molecular Immunology*, 87, 67–75.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.04.003>

- Ward, M. R., Pasterkamp, G., Yeung, A. C., & Borst, C. (2000). Arterial Remodeling. *Circulation*, 102(10), 1186–1191. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.10.1186>
- Waseda, K., Miyazawa, A., Ako, J., Hasegawa, T., Tsujino, I., Sakurai, R., Yock, P. G., Honda, Y., Kandzari, D. E., Leon, M. B., & Fitzgerald, P. J. (2009). Intravascular Ultrasound Results From the ENDEAVOR IV Trial. Randomized Comparison Between Zotarolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents in Patients With Coronary Artery Disease. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2(8), 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2009.05.015>
- Wiley, S. R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J. A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T. O., Smith, C. A., & Fanslow, W. C. (2001). A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity*, 15(5), 837–846. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00232-1)
- Wiley, S. R., & Winkles, J. A. (2003). TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 14, Issues 3–4, pp. 241–249). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00019-4)
- Winkles, J. A. (2008). The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 7, Issue 5, pp. 411–425). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd2488>
- Wolf, C., Cai, W. J., Vosschulte, R., Koltai, S., Mousavipour, D., Scholz, D., Afsah-Hedjri, A., Schaper, W., & Schaper, J. (1998). Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(11), 2291–2305. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0790>
- Wu, C. H., Pan, J. S., Chang, W. C., Hung, J. S., & Mao, S. J. T. (2005). The molecular mechanism of actinomycin D in preventing neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Journal of Biomedical Science*, 12(3), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-6900-5>
- Yoshida, T., & Owens, G. K. (2005). Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. In *Circulation Research* (Vol. 96, Issue 3, pp. 280–291). <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e>
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Burkey, B., & Maeda, N. (1994). Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *Journal of Clinical Investigation*, 94(3), 937–945. <https://doi.org/10.1172/JCI117460>
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), 468–471. <https://doi.org/10.1126/science.1411543>
- Zheng, T. S., & Burkly, L. C. (2008). No end in site: TWEAK/Fn14 activation and autoimmunity associated- end-organ pathologies. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(2), 338–347. <https://doi.org/10.1189/jlb.0308165>
- Zhi, Y., Gao, P., Xin, X., Li, W., Ji, L., Zhang, L., Zhang, X., & Zhang, J. (2017). Clinical significance of sCD163 and its possible role in asthma (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 15, Issue 5, pp. 2931–2939). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6393>



***ANEXO***

## Anexo

Durante la realización de esta tesis doctoral se ha contribuido a la publicación de los siguientes artículos:

- Gutiérrez-Muñoz, C.\*, Méndez-Barbero, N.\*, Svendsen, P., Sastre, C., Fernández-Laso, V., Quesada, P., Egido, J., Escolá-Gil, J. C., Martín-Ventura, J. L., Moestrup, S. K., Blanco-Colio, L. M. (2020). **CD163 deficiency increases foam cell formation and plaque progression in atherosclerotic mice.** *FASEB Journal*, 34(11), 14960–14976. <https://doi.org/10.1096/fj.202000177R>.
- Méndez-Barbero, N., Gutiérrez-Muñoz, C., Blázquez-Serra, R., Martín-Ventura, J., & Blanco-Colio, L. (2020). **Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK)/Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 (Fn14) Axis in Cardiovascular Diseases: Progress and Challenges.** *Cells*, 9(2), 405. <https://doi.org/10.3390/cells9020405>.
- Méndez-Barbero, N.\*, Yuste-Montalvo, A.\*, Nuñez-Borque, E., Jensen, B. M., Gutiérrez-Muñoz, C., Tome-Amat, J., Garrido-Arandia, M., Díaz-Perales, A., Ballesteros-Martinez, C., Laguna, J. J., Beitia, J. M., Poulsen, L. K., Cuesta-Herranz, J., Blanco-Colio, L. M., & Esteban, V. (2020). **The TNF-like weak inducer of the apoptosis/fibroblast growth factor–inducible molecule 14 axis mediates histamine and platelet-activating factor–induced subcutaneous vascular leakage and anaphylactic shock.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.019>
- Gutiérrez-Muñoz, C.\*, Méndez-Barbero, N.\*, Madrigal-Matute, J., Mínguez, P., Egido, J., Michel, J.-B., Martín-Ventura, J. L., Esteban, V., & Blanco-Colio, L. M. (2019). **A major role of TWEAK/Fn14 axis as a therapeutic target for post-angioplasty restenosis.** *EBioMedicine*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.072>
- Bozic, M.\*, Méndez-Barbero, N.\*, Gutiérrez-Muñoz, C., Betriu, A., Egido, J., Fernández, E., Martín-Ventura, J. L., Valdivielso, J. M., & Blanco-Colio, L. M. (2018). **Combination of biomarkers of vascular calcification and sTWEAK to predict cardiovascular events in chronic kidney disease.** *Atherosclerosis*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.011>

(\*) Autores con contribución equivalente.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:

- Gutiérrez-Muñoz C., Méndez-Barbero N., Svendsen P., Sastre C., Fernández-Laso V., Quesada P., Egido J., Escolá-Gil J. C., Martín-Ventura J. L., Moestrup S. K., Blanco-Colio L. M. CD163 deficiency increases foam cell formation and plaque progression in atherosclerotic mice. *Frontiers in Cardiovascular Research, Budapest 2020 (Postpuesto a 2022)*. Poster.
- Gutiérrez-Muñoz C., Méndez-Barbero N., Quesada P., Martín-Ventura J. L., Blanco-Colio L. M. La deficiencia en Anexina A8 reduce la respuesta inflamatoria y la progresión de la lesión aterosclerótica en ratones ApoE KO. *XXXII Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Valencia 2019*. Comunicación oral. **(Premio mejor comunicación oral)**.
- Méndez-Barbero N., Madrigal-Matute J., Gutiérrez-Muñoz C., Mínguez P., Egido J., Martín-Ventura J. L., Esteban V., Blanco-Colio L. M. TWEAK or Fn14 deficiency inhibits neointimal hiperplasia through reduction of Cyclin/CDKs expression and impaired vascular smooth muscle cells proliferation. *Vascular Discovery Scientific Sessions. Boston, USA, 2019*. Poster.
- Gutiérrez-Muñoz C., Méndez-Barbero N., Moestrup S.K., Martín-Ventura J. L., Blanco-Colio L. M. El papel de CD163 en el retraso de la progresión de la lesión aterosclerótica. *4º Ciclo de seminarios de investigación predoctoral "Margarita Salas". Madrid, 2019*. Comunicación oral. **(Premio accésit comunicación oral)**.
- Méndez-Barbero N., Madrigal-Matute J., Gutiérrez-Muñoz C., Mínguez P., Egido J., Martín-Ventura J. L., Esteban V., Blanco-Colio L. M. TWEAK or Fn14 deficiency inhibits neointimal hiperplasia through reduction of Cyclin/CDKs expression and impaired vascular smooth muscle cells proliferation. *86th European Atherosclerosis Society Congress. Lisbon 2018*. Poster.
- Gutiérrez-Muñoz C., Méndez-Barbero N., Moestrup S.K., Martín-Ventura J. L., Blanco-Colio L. M. CD163 retrasa la progresión de la lesión aterosclerótica en ratones ApoE. *XXXI Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Girona 2018*. Comunicación oral. **(Premio mejor comunicación oral)**.
- Méndez-Barbero N., Madrigal-Matute J., Gutiérrez-Muñoz C., Mínguez P., Egido J., Martín-Ventura J. L., Esteban V., Blanco-Colio L. M. TWEAK or Fn14 deficiency inhibits neointimal

hiperplasia through reduction of Cyclin/CDKs expression and impaired vascular smooth muscle cells proliferation. *Frontiers in Cardiovascular Research, Vienna 2018*. Poster.